**ДЕРЖАВНА СЛУЖБА УКРАЇНИ З ПИТАНЬ БЕЗПЕЧНОСТІ ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ ТА ЗАХИСТУ СПОЖИВАЧІВ**

**ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ ІНСТИТУТ З ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ ТА ВЕТЕРИНАРНО-САНІТАРНОЇ ЕКСПЕРТИЗИ**

# ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА СКАЗУ У ТВАРИН

## МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

**КИЇВ – 2024**

**УДК 636:616.98:578.824.11:616-036.22**

Методичні рекомендації схвалено Вченою радою Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи (протокол № 6 від 19 листопада 2024 року).

Методичні рекомендації затверджено і прийнято до впровадження в практику ветеринарної медицини Науково-методичною радою при Державній службі України з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів (протокол № 7 від 16 грудня 2024 р.).

**Розробники:** Піщанський О. В., Рудой О. В., Сушко М. І., Мандигра С. С., Алєксеєва Г. Б., Дрожже Ж. М., Коваленко В. Л., Уховський В. В.

**Рецензенти:**

*Корнієнко Леонід Євгенійович*, доктор ветеринарних наук, професор, Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи.

*Радзиховський Микола Леонідович*, доктор ветеринарних наук, професор, професор кафедри ветеринарної епідеміології та охорони здоров'я тварин Національного університету біоресурсів і природокористування України.

Лабораторна діагностика сказу у тварин : метод. рекомендації; Піщанський О. В., Рудой О. В., Сушко М. І., Мандигра С. С., Алєксеєва Г. Б., Дрожже Ж. М., Коваленко В. Л., Уховський В. В.; Київ: ДНДІЛДВСЕ, 2024; 58 с.

Методичні рекомендації призначені для лікарів ветеринарної медицини, фахівців державних лабораторій Держпродспоживслужби, науково-дослідних установ та спеціалістів ветеринарної медицини, слухачам ФПК, ветеринарним і біологічним фахівцям, яких цікавлять питання інфекційної патології та епізоотології.

У методичних рекомендаціях описано основні характеристики відбору, транспортування зразків патологічного матеріалу та методів лабораторної діагностики сказу в сучасних умовах, що представлені в «Керівництві з діагностичних тестів та вакцин для наземних тварин»

**©ДНДІЛДВСЕ, 2024**

**ЗМІСТ**


| | | |
|---|---|---|
| Перелік умовних позначень, символів, одиниць, скорочень і термінів | | 4 |
| Вступ | | 6 |
| 1. | **Відбір та транспортування зразків** | 8 |
| 1.1. | Загальні вимоги до відбору зразків | 8 |
| 1.2. | Інструментарій, витратні матеріали та реактиви для відбору зразків | 8 |
| 1.3. | Процедура відбору зразків біологічного/патологічного матеріалу (тканин мозку) для дослідження на сказ | 9 |
| 1.4. | Зберігання, пакування, транспортування та утилізація трупів тварин й зразків біологічного матеріалу | 11 |
| 2. | **Методи лабораторної діагностики сказу** | 12 |
| 2.1. | Метод флуоресціюючих антитіл (МФА) | 14 |
| 2.2. | Біологічна проба на мишах (БП) | 17 |
| 2.3. | Ізоляція вірусу сказу в культурі клітин (ІВКК) | 19 |
| 2.4. | Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) | 21 |
| 3. | **Схема діагностики сказу** | 43 |
| Список використаної літератури | | 47 |
| Додатки | | 51 |

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

БП – біологічна проба.

Біологічний/патологічний матеріал – зразки, отримані від живих або мертвих тварин, що містять або можуть містити патологічні зміни, збудників інфекційних чи паразитарних хвороб та призначені для відправки до лабораторії.

БПА – біологічно патогенний агент.

ВООЗТ – Всесвітня організація охорони здоров'я тварин.

ВРХ – велика рогата худоба.

ДВЗ – делегат відбору зразків (офіційні ветеринарні лікарі, державні інспектори та державні ветеринарні інспектори, фахівці лабораторій, ліцензовані лікарі ветеринарної медицини, мисливці).

ДНДІЛДВСЕ – Державний науково-дослідний інститут лабораторної діагностики і ветеринарно-санітарної експертизи.

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота.

ЕД50 –50 % ефективна доза.

ЗІЗ – засоби індивідуального захисту.

ЗТ-ПЛР-РЧ – полімеразна ланцюгова реакція в режимі реального часу із зворотною транскрипцією.

Знешкодження (знезараження) – зменшення чи усунення небезпечності відходів шляхом механічного, фізико-хімічного чи біологічного оброблення.

ІФА – імуноферментний аналіз.

кДНК – комплементарна дезоксирибонуклеїнова кислота.

ЛД50 –50 % летальна доза.

МО – міжнародні одиниці.

МФА – метод флуоресціюючих антитіл.

Неблагополучний пункт – територія, на якій виявлене епізоотичне вогнище, переважно це населений пункт або частина великого населеного пункту за адміністративним поділом, окрема тваринницька ферма з прилеглими до них вигонами, пасовищами та водоймами, окремі пасовища або урочища, фермерське або мисливське господарство, мисливський лісовий масив та інші об'єкти, на території яких, встановлене епізоотичне вогнище хвороби.

НКА – негативний контроль ампліфікації.

НКВ – негативний контроль виділення.

НЗ – негативний зразок.

НК – нуклеїнові кислоти.

ПЗ – позитивний зразок.

ПКА – позитивний контроль ампліфікації.

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція.

пн – пари нуклеотидів.

РНК – рибонуклеїнова кислота.

РПІФ – реакція прямої імунофлуоресценції.

СОП – стандартна операційна процедура.

Тварини, хворі на сказ – тварини, що перебувають у неблагополучному пункті та проявляють специфічні клінічні ознаки сказу.

Тварини, підозрілі у захворюванні – тварини, що перебувають у неблагополучному пункті та проявляють окремі (не повний спектр) клінічні ознаки захворювання.

Тварини, підозрілі у зараженні – тварини, що перебувають у неблагополучному пункті, не проявляють клінічних ознак сказу, але перебували в контакті з хворими або підозрілими у захворюванні тваринами.

ФБР – фосфатно-буферний розчин.

CVS – Challenge Virus Standard (референс-штам вірусу сказу).

FBS – fetal bovine serum.

ERA – Evelyn Rokitniki Abelseth strain (штам вірусу сказу).

lg –десятковий логарифм.

RTCIT – rabies tissue culture infection test (виділення вірусу сказу в культурі клітин).

$TCID_{50}$ – 50 % клітинно-культуральна інфекційна доза.

# ВСТУП

Сказ відомий як смертельна хвороба з давніх часів, однак сучасне моделювання оцінює, що ця інфекція щорічно є причиною смерті близько 60 000 людей у всьому світі. В Україні, сказ є також актуальною проблемою ветеринарної та гуманної медицини. На початку XXI століття епізоотична ситуація щодо цієї інфекції характеризується як стабільно напружена із періодичними спалахами захворюваності.

Відповідно до класифікації Міжнародного Комітету по таксономії вірусів збудник сказу відноситься до роду *Lyssavirus*, родини *Rhabdoviridae*, порядку *Mononegavirales* [11, 12, 21, 22].

Родина *Rhabdoviridae* включає велику групу вірусів, що вражають як хребетних тварин, так і рослини, і складається з двадцяти родів: *Almendravirus, Alphanemrhavirus, Caligrhavirus, Curiovirus, Cytorhabdovirus, Dichorhavirus, Ephemerovirus, Hapavirus, Ledantevirus, Lyssavirus, Novirhabdovirus, Nucleorhabdovirus, Perhabdovirus, Sigmavirus, Sprivivirus, Sripuvirus, Tibrovirus, Tupavirus, Varicosavirus, Vesiculovirus.* Загалом, станом на 01.05.2021 р. до родини *Rhabdoviridae* включено 143 віруси і один невідведений вид [31].

На сьогодні прийнято терміном «сказ» іменувати усі випадки вірусних інфекційних енцефалітів, що спричинюються будь-якими вірусами з роду *Lyssavirus*. Саме тому Міжнародний комітет з таксономії вірусів (International Committee on Taxonomy of Viruses – ICTV) з 2015 року прийняв рішення про перейменування деяких генетичних варіантів, в тому числі і класичного вірусу сказу – *Rabies virus* в *Rabies lyssavirus*. Рід *Lyssavirus* є одним із найбільших в родині *Rhabdoviridae*. Загалом до роду *Lyssavirus* включено 16 різних за генетичними характеристиками вірусів: *Aravan lyssavirus, Australian bat lyssavirus, Bokeloh bat lyssavirus, Duvenhage lyssavirus, European bat 1 lyssavirus, European bat 2 lyssavirus, Gannoruwa bat lyssavirus, Ikoma lyssavirus, Irkut lyssavirus, Khujand lyssavirus, Lagos bat lyssavirus, Lleida bat lyssavirus, Mokola lyssavirus, Rabies lyssavirus, Shimoni bat lyssavirus, West Caucasian bat lyssavirus* [31].

Зважаючи на значне генетичне різноманіття, ізоляти вірусу сказу, що виділяються в різних регіонах світу, від різних тварин є неоднорідними за своїми імунобіологічними властивостями. Вони можуть відрізнятися за вірулентністю, клінічною картиною спричиненої ними хвороби, тривалістю інкубаційного періоду, здатністю утворювати тільця Бабеша-Негрі, особливостям фіксації та ін.

За цієї інфекції практично відсутня фаза попадання збудника на зовнішні бар'єрні тканини і відразу ж здійснюється фаза проникнення в організм (власне зараження), цілком пов'язана як з властивостями збудника, так і з імунним станом організму. Це визначає важливість вивчення біологічних властивостей вірусу.

Динаміка захворювання на сказ в Україні за останні роки змінилася внаслідок збільшення чисельності популяції серед диких тварин та безпритульних тварин. Через військову ситуацію в країні деякі види профілактики не виконуються в повному обсязі [5].

На сьогодні діагностика сказу проводиться на основі комплексу епізоотологічних, клінічних, патологоанатомічних і лабораторних досліджень.

Беручи до уваги особливу небезпечність захворювання, постановка остаточного діагнозу здійснюється лише за результатами лабораторних досліджень [13].

У системі контролю сказу серед тварин провідне місце займає своєчасна якісна та швидка лабораторна діагностика. Сказ – це головний зооноз, для якого стандартизовані методи діагностики, а також усі заходи з контролю сказу знаходяться під егідою ВООЗ. В Україні основним методом діагностики сказу є реакція прямої імунофлуоресценції (в основі якої є метод флуоресцюючих антитіл (МФА)), а у випадку отримання сумнівних результатів, проводиться постановка біологічної проби на білих мишах. Не дивлячись на те, що біологічна проба є високочутливим методом діагностики сказу, він має суттєві недоліки: потрібна велика кількість тварин та спеціальні умови їхнього утримання, тривалий період проведення тесту – 30 днів (відповідно ДСТУ 7053:2009 «Методи діагностики сказу»), що обумовлює пізню відповідь про наявність або відсутність захворювання [1, 3, 4, 9]. Альтернативою біопробі для виділення вірусу сказу з патологічного матеріалу є використання різних перещеплюваних ліній клітин, використання яких дозволяє протягом 24–72 год ізолювати вірус сказу з патологічного матеріалу.

Також важливим є використання полімеразної ланцюгової реакції, як одного з ефективних та високоспецифічних методів діагностики інфекційних хвороб тварин [7, 8, 24].

## 1. Відбір зразків та транспортування

### 1.1. Загальні вимоги до відбору зразків.

Відповідно до законодавства України робота з відбору зразків біологічного/патологічного матеріалу для дослідження на сказ повинна проводитись з дотриманням правил техніки безпеки – у відповідному спецодязі та ЗІЗ. Весь персонал, який працює з матеріалом, підозрілим в зараженні на сказ, повинен бути вакцинований проти сказу у встановленому порядку за рахунок роботодавця.

Лабораторні дослідження матеріалу на сказ проводять позачергово та безкоштовно. Про результати дослідження (проміжні та заключні) негайно повідомляють установу ветеринарної медицини або спеціаліста, який направив матеріал, а також головного лікаря ветеринарної медицини району (міста), які в свою чергу повідомляють відповідні державні заклади охорони здоров'я.

Роботи з матеріалом, підозрілим в зараженні на сказ, проводять у спеціалізованих лабораторіях. До роботи допускають тільки підготовлений персонал після отримання відповідного допуску. Люди, які працюють в лабораторіях з діагностики сказу, ризикують бути зараженими в результаті випадкового інфікування слизових оболонок під час роботи з патологічним матеріалом, або під час контакту з аерозолями, які утворюються в процесі приготування суспензії та зараження тварин під час постановки біологічної проби, травмуватись при відборі зразків. Тому всі маніпуляції з матеріалом, підозрілим на зараження сказом, необхідно проводити таким чином, щоб унеможливити утворення аерозолів. Особливу увагу необхідно звернути на роботу із нативним матеріалом, скельцями для мазків-відбитків.

Розтин трупа, виймання мозку та інші роботи з патологічним матеріалом проводять в умовах суворого дотримання заходів особистої безпеки: голову тварини міцно фіксують, руки захищають двома парами рукавичок – хірургічними й анатомічними, очі – окулярами-консервами, ніс і рот – 6-шаровою марлевою пов’язкою або використовують маску-забрало. Для цієї роботи використовують протичумний костюм 1 типу, ЗІЗ. Особам, не щепленим проти сказу, доступ в приміщення, де проводяться роботи з матеріалом, заборонений.

Відбір крові від тварин проводиться з метою оцінки рівня антирабічного імунітету зажиттєво від домашніх тварин та після відстрілу (посмертно) від диких тварин. Під час проведення програми пероральної вакцинації диких м’ясоїдних тварин проти сказу, одним із етапів є оцінка ефективності кампанії – вибірковий відстріл лисиць та відбір біоматеріалу в польових умовах.

Під час відбору крові дотримуються правил асептики та антисептики. Місце уколу ретельно протирають ватним тампоном, змоченим 70 % спиртовим розчином. Пробірки з кров’ю чи/ або сироваткою крові повинні бути марковані й щільно закриті. Пробірки транспортують з вимогою температурного режиму та супровідним документом встановленого зразка.

Тварини (собаки, коти, фредки), що переміщуються до ЄС та інших країн світу, походять з/або транзитом через територію або третю країну згідно Регламенту Комісії (ЄС) № 577/2013, досліджуються на титр антирабічних антитіл. Відбір крові проводять, не менш ніж за 30 днів після попередньої

вакцинації проти сказу і принаймні за три місяці до перетину кордону. Дослідження на титр антирабічних антитіл повинно бути виконано в лабораторії, затвердженій Європейською Комісією відповідно до статті 3 Рішення Ради 2000/258/ЄС (список лабораторій доступний за посиланням: http://ec.europa.eu/food/animal/liveanimals/pets/ approval_en.htm ). Докладна інформація за посиланням: https://vet.gov.ua/poslugi/favn-test-na-antitila-do-skazu/ [11, 12].

### 1.2. Інструментарій, витратні матеріали та реактиви для відбору зразків.

Необхідно переконатися в наявності відповідних ЗІЗ, інструментів та устаткування для відбору зразків, а саме: рукавичок гумових/латексних одноразових; комбінезонів; захисту для вух, очей (окулярів-консервів); респіратору (маски захисної); чобіт гумових; ножів, ножиць, щипців; стерильних разових шприців (щипці і скальпель тощо); контейнерів для проб; 70 % спиртового розчину; вати, марлі, адсорбуючого матеріалу; маркерів, ручок, олівців; термоконтейнерів із холодовими елементами; інструментарій для розтину черепної коробки та щелеп [2].

Крім того, необхідно мати блокнот для записів з планшетом, зразки бланків супровідних документів, мішки для сміття та стрічки для їх зав'язування, етикетки для проб і заздалегідь підписані пробірки, обприскувач (заповнений одним з дезінфікуючих розчинів (1–2 % лізолу, 3 % їдкого натру, 5 % формаліну, 3 % хлораміну, 2 % соляної кислоти, 3–5 % карболової кислоти, або іншими препаратами, що нейтралізують вірус (використовують згідно настанови щодо застосування)), щітку для миття взуття, відро, адсорбуючий матеріал для пакування проб.

Для обробки рук використовувати мийні засоби, дезінфектанти для обробки ран у хірургічній практиці або іншими засобами (70 % етанолом або 5 %-м розчином йоду), які нейтралізують вірус.

Вірус сказу може тривало зберігатися при низьких температурах, а також у трупах тварин. Під час кип'ятіння він знешкоджується за 2 хв. За температури 60°С гине протягом 10–15 хв. Згубно діють на вірус пряме сонячне світло та ультрафіолетове опромінення, а також висихання чи повторне заморожування та розморожування субстратів, що містять вірус.

Вищезазначені інструменти, дезінфікуючі розчини та устаткування повинні бути підготовлені заздалегідь, зберігатися у постійному режимі, періодично переглядатися та поновлюватися.

### 1.3. Процедура відбору зразків біологічного/ патологічного матеріалу (тканин мозку) для дослідження на сказ.

У лабораторію для дослідження на сказ направляють свіжі трупи або голови дрібних тварин, від великих тварин – голови. Матеріал повинен бути свіжим, не пізніше 12 год з моменту загибелі тварини, враховуючи пору року.

Відбирають проби головного мозку для дослідження в лабораторії одним із методів:

– розтином черепної коробки (рис. 1);

– повздовжнім розпилюванням голови (рис. 2);
– без розтину черепної коробки.

Зазвичай проводять розтинання черепної коробки з наступним відбиранням мозку.

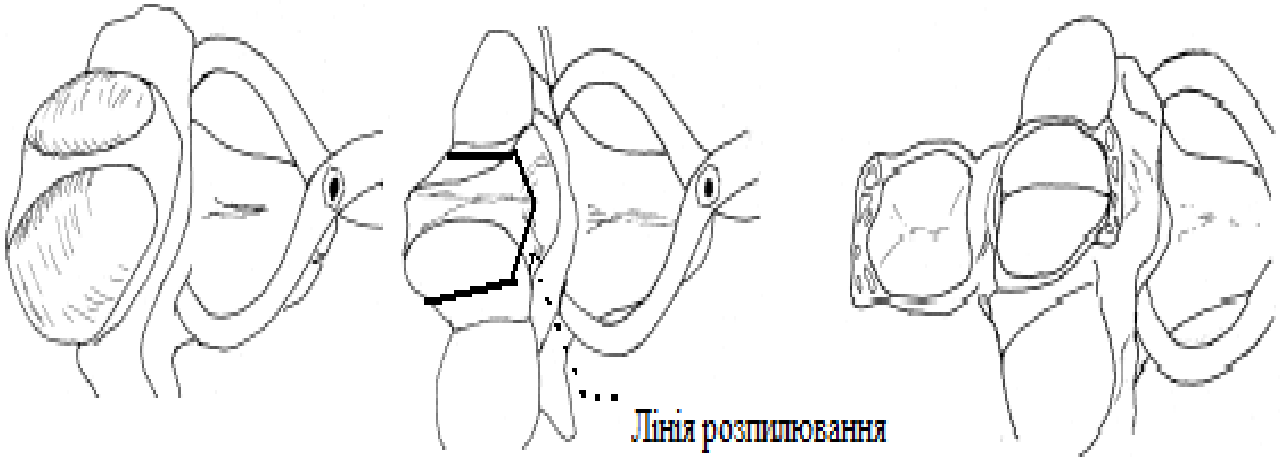


**Рис. 1. Метод розтину черепної коробки**

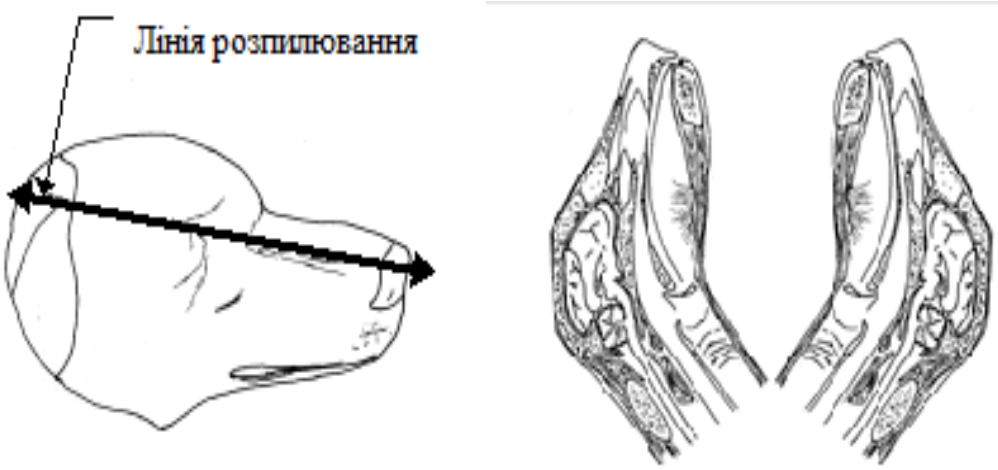


**Рис. 2. Метод повздовжнього розпилювання голови**

З головного мозку відбирають проби з таких ділянок мозку: кори великих півкуль, мозочку, довгастого мозку та амонового рогу (рис. 3.).

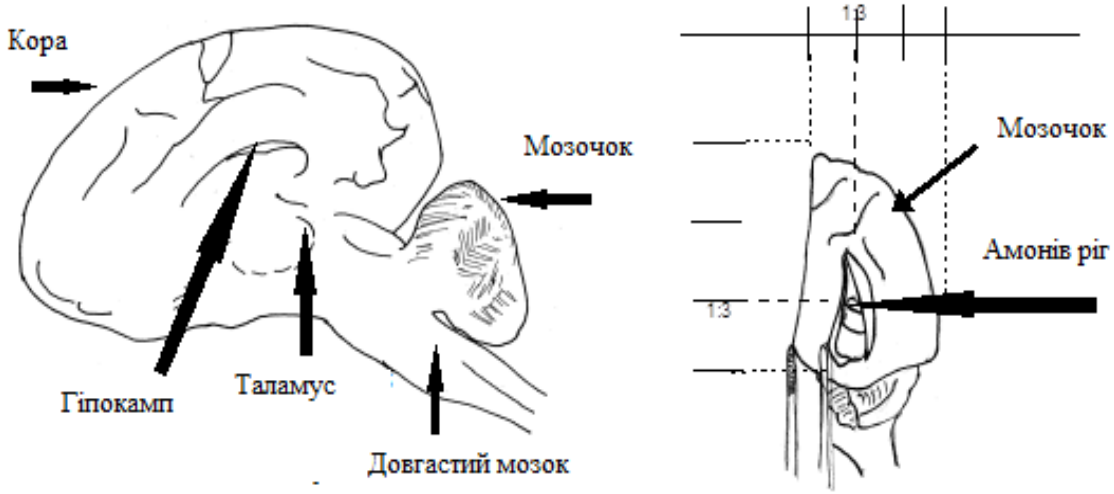


**Рис. 3. Відбір зразків головного мозку тварин для дослідження**

Під час відбирання значної кількості зразків від диких тварин, рекомендовано використовувати один з методів відбирання зразків мозку для дослідження без розтину черепа: відбір через потиличний отвір (рис. 4) або ретроорбітальний метод з використанням металевої трубки (діаметром до 0,5 см). Практично під час відбору зразків від диких тварин переважно надсилають у лабораторію труп тварини, рідше відокремлену голову тварини.

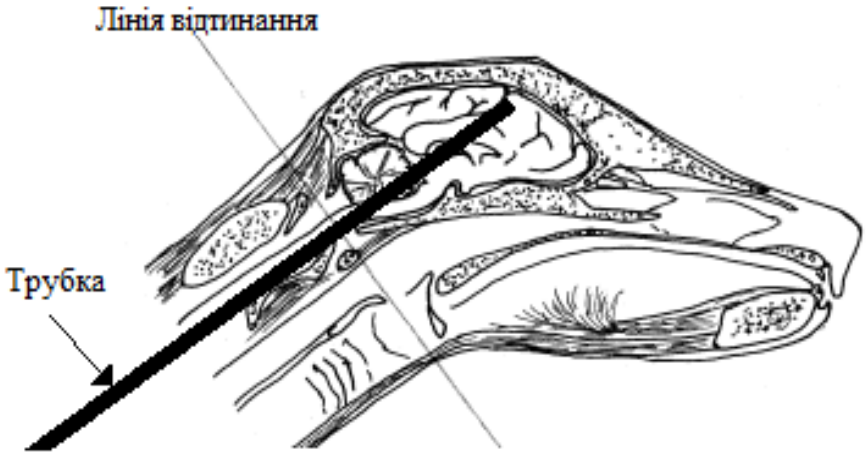


**Рис. 4. Відбір проб без розтину черепа**

Відбір частини зразку мозку проводять у пластикові контейнери та/або пробірки на 5–10 $см^3$ для зберігання в замороженому вигляді в морозильній камері за температури мінус 70±2°С як резервний зразок. Частину мозку зберігають у замороженому вигляді протягом 3 міс. Цей мозковий матеріал використовується у разі невдачі рутинної діагностики, потім він буде використаний для всіх тестів, крім гістології.

### 1.4. Зберігання, пакування, транспортування та утилізація трупів тварин й зразків біологічного матеріалу.

Перевезення зразків біологічних/патологічних матеріалів з однієї лабораторії в іншу, або з місця їх відбору до лабораторії дозволяється тільки з особою, яка супроводжує вантаж.

Проби доставляють посильним з відповідним супровідним документом та актом, де вказують вид тварини, адресу угідь, де був проведений відстріл, дату вакцинації, дату відбору проб крові, назву та серію вакцини, яку використовували для імунізації (Додаток 1, 2).

Під час транспортування матеріалу для діагностики сказу (голови тварин або зразків мозку) унеможливлюють ризик контамінації людей. Під час транспортування підозрілого в зараженні на сказ матеріалу, мозок уміщують у вологонепроникний контейнер; голови тварин загортають у абсорбуючий матеріал, заклеюють у пластиковий пакет і опечатують, після чого поміщають в контейнер з охолоджувачем.

Відібрані проби головного мозку зберігають за температури мінус 20ºС до завершення всіх необхідних досліджень. Після закінчення досліджень весь

матеріал знешкоджують шляхом автоклавування в режимі тиску 1,5 атмосфери, протягом 1 год.

Для пакування зразків використовують систему «потрійної упаковки», що передбачає **первинну** стерильну, водонепроникну й герметичну ємність, яка обгорнута адсорбуючим матеріалом; **вторинна** ємність водонепроникна й герметично закрита виготовлена з міцного пластику або металу та адсорбуючим матеріалом; **зовнішня** – міцна й жорстка ємність (рис. 5).

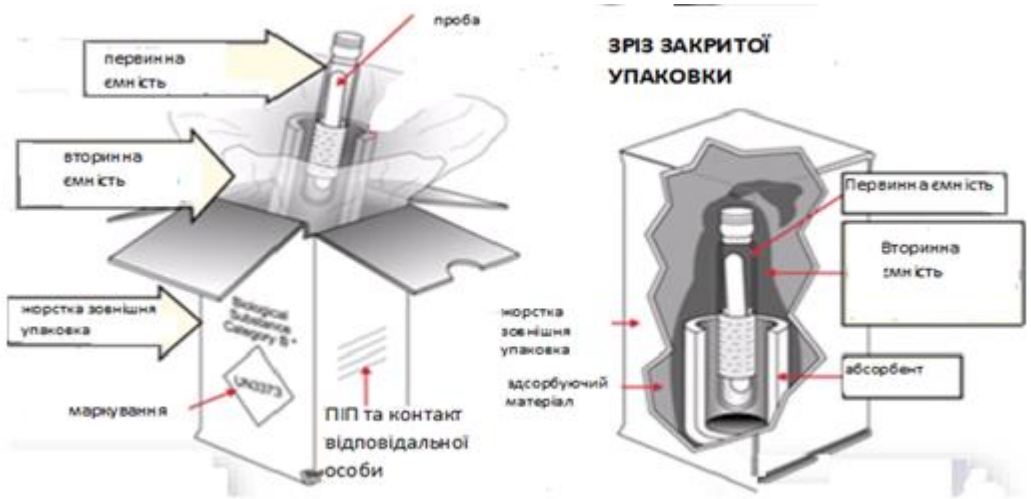


**Рис. 5. Система «потрійної упаковки» для транспортування біологічного матеріалу**

Відібраний патологічний матеріал поміщають виключно у міцний пластиковий посуд.

Герметично запаковують, обгортають марлею змоченою дезінфікуючим розчином.

Контейнери з біологічним/патологічним матеріалом поміщають в поліетилен, обкладають льодом та вкладають в термос, який герметично закривають та опечатують.

Відправляють з супроводом до лабораторії.

В неблагополучному пункті тварин щеплюють проти сказу, виявляють хворих та підозрілих у зараженні на сказ, умертвляють хворих на сказ тварин, а також підозрілих у захворюванні. Трупи тварин, яких піддали умертвінню за показаннями сказу, загиблих або підозрілих у захворюванні підлягають обов'язковому термічному знешкодженню (спалюванню разом зі шкірою).

**2. Методи лабораторної діагностики сказу.**

У випадку сказу немає чітких патогномонічних уражень, а також специфічних і постійних клінічних ознак сказу, тому заключний діагноз можна поставити лише в лабораторії. Лабораторні методики переважно застосовують на тканинах центральної нервової системи (Амонів ріг, таламус, кора головного мозку, мозочок і довгастий мозок). Лабораторії повинні дотримуватися відповідних умов біобезпеки та біозахисту, що визначаються відповідним аналізом біоризиків.

Відповідно до «Керівництва з діагностичних тестів та вакцин для наземних тварин» [24] ідентифікація збудника проводиться за допомогою первинних діагностичних тестів, таких як тест МФА, прямий швидкий імуногістохімічний тест (ПШІТ) або ПЛР. Тести МФА, ПШІТ і ПЛР дають надійний діагноз у 98–100 % випадків для будь-яких штамів ліссавірусів, якщо використовується відповідний кон'югат або праймер/ зонд. Для великої кількості зразків більш доцільно застосування ПЛР у режимі реального часу.

У випадках непереконливих результатів отриманих при застосуванні первинних діагностичних тестів (МФА, ПШІТ або ПЛР) рекомендуються подальші підтверджуючі тести (на клітинних культурах або на мишах) для цього зразку. Ізоляція вірусу в культурі клітин (ІВКК) повинно з часом замінити тест БП, особливо це є важливим при отриманні статусу «країни вільної від сказу».

*Таблиця 1*

**Методи діагностики сказу (відповідно Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals)**

| Метод | Призначення | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **Вільна від інфекції** | **Сприяння викоріненню** | **Підтвердження випадків** | **Нагляд** |
| МФА/ DFA (виявлення антигену) | +++ | +++ | +++ | +++ |
| ПШІТ/ dRIT (виявлення антигену) | +++ | +++ | +++ | +++ |
| ІФА/ ELISA (виявлення антигену) | + | + | + | + |
| ІВКК/ (RTCIT) (ізоляція вірусу) | + | +++ | +++ | +++ |
| БП/ MIT (ізоляція вірусу) | н/з | + | + | + |
| звичайна ЗТ-ПЛР (виявлення РНК) | +++ | +++ | +++ | +++ |
| ЗТ-ПЛР-РЧ (виявлення РНК) | +++ | +++ | +++ | +++ |

З наведених в «Керівництві з діагностичних тестів та вакцин для наземних тварин» методів лабораторної діагностики сказу в Україні прямий швидкий імуногістохімічний тест (ПШІТ) та імуноферментний аналіз (ІФА) в рутинній діагностиці сказу не застосовується.

Принцип постановки ПШІТ полягає у використанні суміші з висококонцентрованими й очищеними біотинільованими моноклональними антитілами, специфічніми для нуклеопротеїну, кон'югованого з ферментативною міткою з подальшою візуалізацією за допомогою субстрату 3-аміно-9-етилкарбазол [23].

Прямий швидкий імуногістохімічний тест, також можна використовувати як альтернативу тесту МФА у рутинній діагностиці сказу, оскільки він має подібну

чутливість та специфічність [28]. Принцип постановки схожий на МФА тест, за винятком того, що ПШІТ використовує для фарбування стрептавідин-біотин пероксидазою. Цей тест можна використовувати в лабораторіях, які не мають люмінесцентного мікроскопу. Основною вимогою для впровадження в лабораторну діагностику цього тесту є перевірка первинних антитіл на предмет специфічності й чутливості з урахуванням регіонального різноманіття ізолятів ліссавірусів.

Тест-системи для ІФА, якими виявляють антиген вірусу сказу, можуть бути корисними лише для великих епідеміологічних обстежень [35].

Для усіх рекомендовах тестів лабораторної діагностики сказу щорічно в референс-лабораторіях ВООЗТ організовуються міжлабораторні раунди підтвердження кваліфікації, що рекомендується для забезпечення якості. На національному рівні міжлабораторні порівняльні дослідження та раунди організовуються для регіональних лабораторій Держпродспоживслужби України Референц-центром з діагностики заразних хвороб тварин Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики га ветеринарно-санітарної експертизи (ДНДІЛДВСЕ).

### 2.1. Метод флуоресціюючих антитіл (МФА).

Метод флуоресціюючих антитіл (РПІФ – реакція прямої імунофлуоресценції, або DFA – Direct Fluorescent Antibody, або FAT – Fluorescent Antibody Test), цей метод використовується безпосередньо для фарбування мазків-відбитків мозку. Він також використовується для підтвердження наявності антигену вірусу сказу в культурі клітин, або в тканинах мозку мишей, які були інфіковані з діагностичною метою при постановці біологічної проби (БП).

Метод використовується для виявлення антигену вірусу сказу за допомогою кон'югату – специфічних антитіл, поєднаних з флуорохромом – флуоресцеїнізотіоціонатом (ФІТЦ). За допомогою методу виявляється специфічне світіння комплексу «антиген – антитіло» при люмінесцентній мікроскопії мазків-відбитків головного мозку.

Мазки фіксують у 100 % високоякісному ацетоні за температури мінус 20°С не менше 20 хв, або фіксують нагріванням, пропускаючи скельця 2-3 рази через полум'я. Потім вони висушуються на повітрі, а потім фарбуються специфічним кон'югатом, який розведено до робочого розведення, протягом 30 хв за температури 37°С у вологій камері. Потім дослідні скельця перевіряють на предмет специфічної флуоресценції за допомогою люмінесцентного мікроскопу та фільтра, що відповідає довжині хвилі (збуджуючий фільтр 492 nm, запираючий фільтр 510 nm). Агрегати нуклеокапсидного білку ідентифікуються за специфічною флуоресценцією кон'югату. Рекомендується, щоб два незалежних досвідчених оператора проводили читку реакції МФА. Визначені антигенні ділянки нуклеокапсидного білку дозволяють ідентифікувати всі ліссавіруси за допомогою сучасних комерційних препаратів поліклональних кон'югатів проти сказу, що використовуються для діагностичних досліджень мозкової тканини, тоді як кон'югати на основі моноклональних антирабічних антитіл можуть мати обмежену чутливість до різних ліссавірусів.

Тест МФА може бути застосований до зразків, консервованих гліцерином, після етапу промивання. Якщо зразок зберігався у формаліновому розчині, тест МФА може бути використаний лише після того, як патологічний матеріал буде оброблений протеолітичним ферментом [33, 34].

*Основні етапи та вимоги безпеки.* Матеріал, який надійшов на дослідження, вважається потенційно інфікованим, тому дослідження необхідно проводити тільки в типових, або спеціально пристосованих приміщеннях, які відповідають вимогам біобезпеки і забезпечені всіма засобами захисту персоналу, що працює в них.

Всі етапи реакції слід проводити в шафах біологічної безпеки 2–го класу. Етап фіксації ацетоном проводити в спеціальній шафі біологічної безпеки 2–го класу, призначеному для роботи з ацетоном.

Компоненти реакції (контрольні препарати, кон'югат) є біологічними матеріалами, тому з ними і з досліджуваними зразками поводяться як з біологічно небезпечними матеріалами. Не допускаються прямі контакти з біологічним матеріалом.

Після закінчення роботи робоче місце необхідно обробити дезрозчином (згідно інструкцій по використанню дезінфектантів).

*Матеріалом* для дослідження є зразки головного мозку.

*Реактиви*: Діагностичний антирабічний флуоресціюючий імуноглобулін; ємність для відпрацьованого матеріалу; розчин для дезінфекції – 3 % гідроокису натрію, або інші дезінфікуючі розчини; фосфатно-буферний розчин (ФБР) без іонів Са та Mg (pH 7,0 – 7,2); етанол 96°С; нефлюоресціююче імерсійне масло; ацетон хімічно чистий (за потреби); забуферений розчин гліцерину pH 9,5.

Засоби вимірювальної техніки та випробувальне обладнання: предметні скельця; чашки Петрі; камера для промивання мазків-відбитків; спиртівка; шафа біологічної безпеки; холодильник; термостат з температурою 37±0,5°С; мікроскоп люмінесцентний, оснащений для блакитної флюоресценції/збуджуючий фільтр 492 nm, запираючий фільтр 510 nm, який дає збільшення від 150 до 250.

***Протокол постановки тесту МФА.***

*Приготування мазків-відбитків.*

З кожного зразку мозку готують два мазки-відбитки з Амонового рогу, довгастого мозку, мозочку, кори півкуль головного мозку. Мазки-відбитки підписуються /ідентифікуються/ та висушуються на повітрі.

*Фіксація.*

Фіксація мазків-відбитків може проводитися двома методами: хімічно чистим ацетоном за температури мінус 20°С протягом 30 хв, або над полум'ям спиртівки. Фіксація в ацетоні не інактивує вірус сказу, фіксовані мазки повинні розглядатися, як потенційно інфіковані.

*Процедура фарбування.*

До ліофілізованого кон'югату, в кожний флакон додається у кількості 1,0 мл дистильованої води. Перед початком фарбування кон'югат розводиться забуференим розчином до робочого розведення, яке зазначається виробником в настанові по використанню набору. Розведений до робочого розведення кон'югат не зберігається, а невикористаний в день розведення знешкоджується.

На скельця наноситься кон’югат в робочому розведенні в кількості 100 мкл на один мазок-відбиток. Далі мазки-відбитки інкубуються протягом 30 хв за температури 37°С в вологій камері.

*Використання контролів.*

Під час фарбування мазків використовуються стандартизовані контролі, або власного виготовлення:

- одне скельце з мазком-відбитком головного мозку миші, попередньо інфікованої вірусом сказу (CVS – референс-штам вірусу сказу);

- негативний мазок – контроль готується з нормального мозку миші.

Контролі використовуються кожного разу під час фарбування, що підтверджує правильність проведеної процедура. Результати фарбування вважаються достовірними, якщо результати контролів відповідають очікуваним.

*Промивання.*

Після етапу фарбування скельця з мазками-відбитками:

- в камері для промивання тричі промиваються кожен раз витримуючи 10 хв у фосфатно-буферому розчином (pH 7,0-7,2);

- після третього промивання ФБР скельця споліскують дистильованою водою та висушують на повітрі.

*Монтаж скелець для мікроскопії.*

На предметне скельце на мазок-відбиток наноситься крапля забуференого розчину гліцерину pH > 8. Значення pH гліцеринового розчину впливає на ефективність флуоресценції ФІТЦ, а pH < 4 може зруйнувати зв’язок антигену з антитілом. Зверху мазок покривається покривним скельцем.

*Мікроскопія.*

Перед початком мікроскопії необхідно впевнитися в правильному фокусуванні системи світла в мікроскопі. Мікроскопія повинна бути проведена незалежно двома експертами, які після завершення дослідження порівнюють отримані результати.

*Інтерпретація результатів.*

Якщо результат фарбування трьох контролів не відповідає очікуваному, результат фарбування методом МФА вважається недостовірним і не може бути врахований.

Негативний результат – мозкова тканина світиться тьмяним від сірувато до жовто-зеленкуватого кольору (рис. 6).

Позитивний результат – у препараті виявляють гранули різної форми і величини, які світяться яскраво жовто-зеленим кольором. Гранули розташовані в нейронах і за межами клітин. В одному полі зору повинно бути не менше 10 характерних гранул (рис. 7).

Якщо виникає розбіжність в інтерпретації результатів, мікроскопія проводиться знову за участю третього експерта. Якщо результат знову невизначений, матеріал вважається сумнівним щодо сказу і підлягає подальшому дослідженню.

***Приклади:***

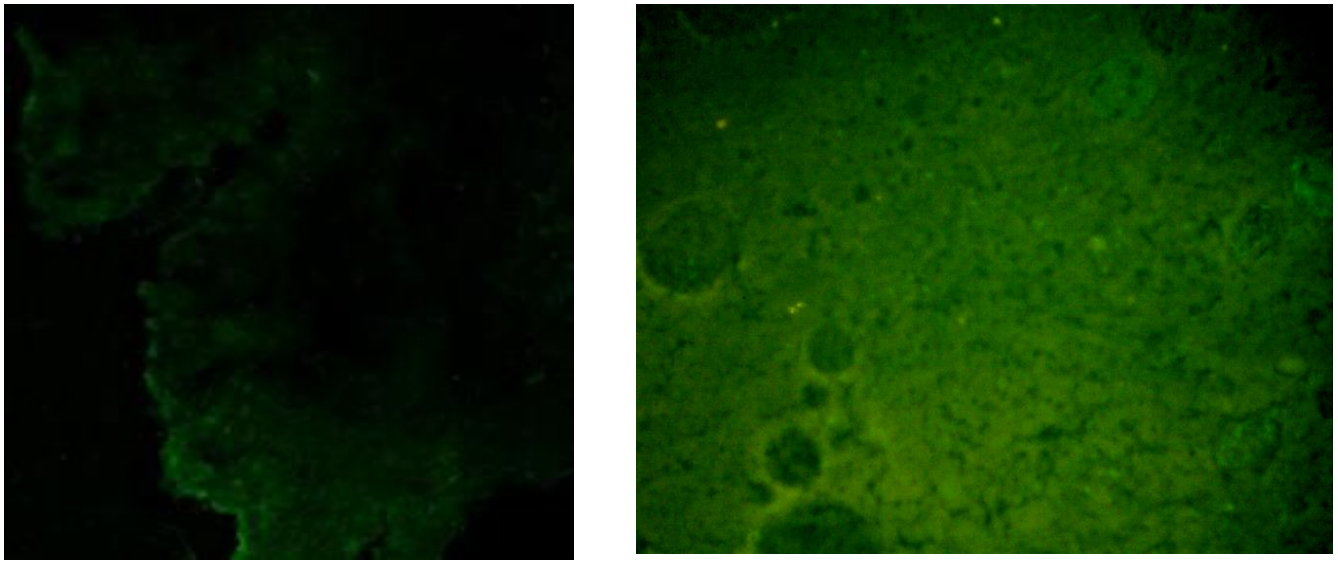

**Рис. 6. Негативні на сказ мазки-відбитки патологічного матеріалу**

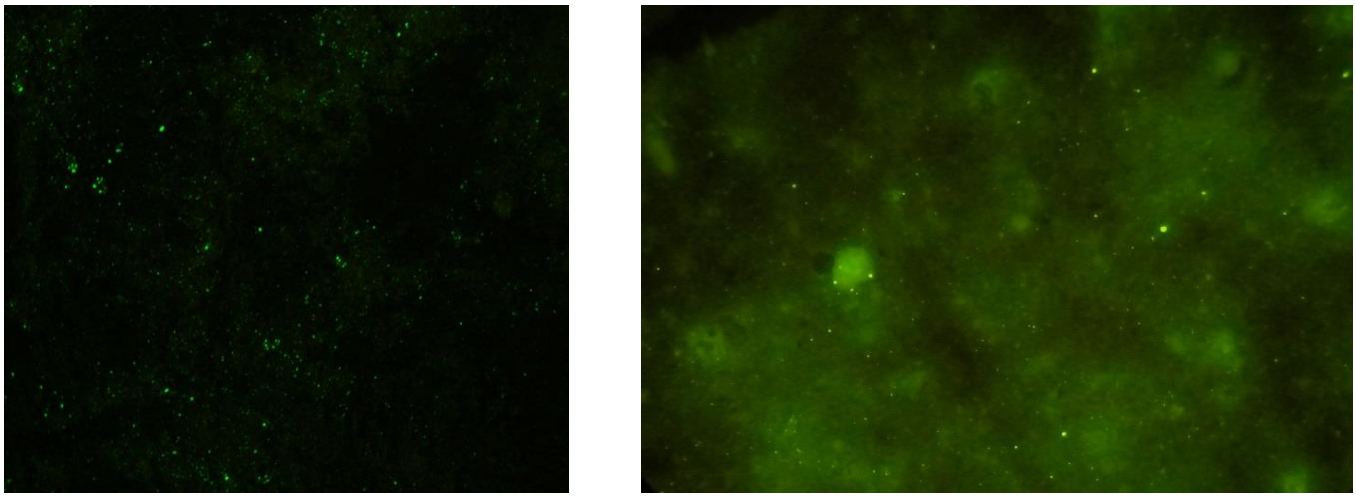

**Рис. 7. Позитивні на сказ мазки-відбитки патологічного матеріалу**

**2.2. Біологічна проба на мишах.**

Лабораторна діагностика сказу за допомогою біологічної проби ґрунтується на виділенні вірусу від хворих, забитих або трупів тварин шляхом інокуляції суспензії патологічного матеріалу в мозок білих мишей і наступною його ідентифікацією тестом МФА, або іншим методом.

Методика приготування суспензії із мозку для інтрацеребрального зараження білих мишей, а також проведення біопроби та інтерпретація її результатів приведені в настановах з діагностики сказу [24].

*Вимоги безпеки щодо постановки БП.* Матеріал, який використовується для постановки біологічної проби за негативного результату МФА є потенційно інфікованим, тому дослідження необхідно проводити тільки в спеціально пристосованих приміщеннях (віварій), які відповідають вимогам біобезпеки і забезпечені всіма засобами захисту персоналу, що працює в них.

Заражених лабораторних тварин утримують у закритому ізольованому приміщенні з окремим входом, де повинен бути металевий бак для збору заразного матеріалу з кліток, стіл з металевим покриттям, який встановлюють у кімнаті для зараження лабораторних тварин, 5 % карболової кислоти для дезінфекції інструменту, дезінфікуючий розчин для дезінфекції рукавиць та ємкість із дезінфікуючим розчином для знезараження кліток.

Інфікований матеріал вводять стерильним шприцом, попередньо підібраним і перевіреним на придатність (притертість поршня циліндра, прохідність голки).

У кімнатах, де розміщені інфіковані тварини, необхідно щоденно проводити вологе прибирання з 5 % хлораміну, або з іншим дезінфікуючим засобом відповідно до інструкції виробника.

Усі маніпуляції з інфікованими тваринами, кормами, підстилкою та ін. проводять відповідно до Наказу Міністерства праці та соціальної політики України № 67 від 20.04.99 «Про затвердження Правил охорони праці в лабораторіях ветеринарної медицини».

Біологічні матеріали є зразки з головного мозку від підозрілих на сказ тварин та лабораторні тварини. Для діагностики сказу використовуються новонароджені білі миші-сисуни або молоді білі миші вагою не більше 12–14 г (3–4 тижні віку).

*Реактиви*: антибіотики (стрептоміцин, пеніцилін); етанол 70º, вата; дезінфікуючий рочин – 4 % гідроокису натрію або інший, придатний для знешкодження вірусів; натрію хлорид 0,85 %.

*Розхідні матеріали та обладнання:* стерильні полістиролові пробірки з кришками, що загвинчуються; 0,3/0,5/1 $см^3$ інсулінові шприци з фіксованою нез'ємною голкою товщиною 29Gx1/2" (0,33 мм х 13 мм); ступки, пестики; дозатори для розливу рідин на 2–3 $см^3$; стерильні наконечники.

***Протокол постановики БП.***

*Підготовка зразку.* Для підготовки суспензії необхідно відібрати шматочки амонового рогу, кори півкуль, мозочка, довгастого мозку. Тканину подрібнити ножицями і розтерти в ступці, додаючи ізотонічний розчин натрію хлориду. Для інфікування мишей готується мозкова суспензія 1:10 (10 %). Суспензію центрифугують в режимі 2000 об/хв протягом 5–10 хв, або відстоюють до осідання великих часточок й утворення прозорого надосаду. Надосадову рідину переносять пастерівською піпеткою у стерильну поліпропіленову пробірку з кришкою, яка загвинчується. У суспензію додають 500 МО пеніциліну і стрептоміцину на 1 $см^3$ суспензії з подальшою інкубацією за температури 18±2ºС протягом 30 хв. Суспензія зберігається до використання в холодильнику за температури 4±1ºС.

Цей спосіб отримання суспензії мозкової тканини володіє певними недоліками: довготривалий контакт мозку з навколишнім середовищем, що створює можливість контамінації вірусовмісного середовища сторонньою мікрофлорою, а також є небезпека забруднення вірусом сказу боксу, що створює загрозу життю працівників лабораторії. Є інші варіанти приготування суспензії, а саме: у стерильному герметично закритому поліпропіленовому флаконі шляхом триразового заморожування–відтаювання шматочків мозку з енергійним струшуванням за кожного відтаювання [6, 8].

*Інфікування мишей*. Для дослідження одного зразку патологічного матеріалу використовують білих мишей у кількості 6-10 голів віком 3-4 тижні, або виводок мишей-сисунів. Мишам вводять інтрацеребрально 0,03 $см^3$ мозкової суспензії (0,02 $см^3$ для мишей-сисунів).

*Спостереження за зараженими мишами.* Після введення інокуляту інфікованих мишей поміщують в клітки та оформлюють облікову картку, в якій щоденно роблять відповідні записи. На клітки прикріпляють етикетки, де вказують номер експертизи, дату зараження, найменування матеріалу або культури та кількість заражених тварин. Крім цього, інформацію щодо кількості заражених тварин, метод зараження, матеріал, дозу й результат спостережень за тваринами заносять у журнал вірусологічних досліджень (Додаток 3. «ф. 13-вет»).

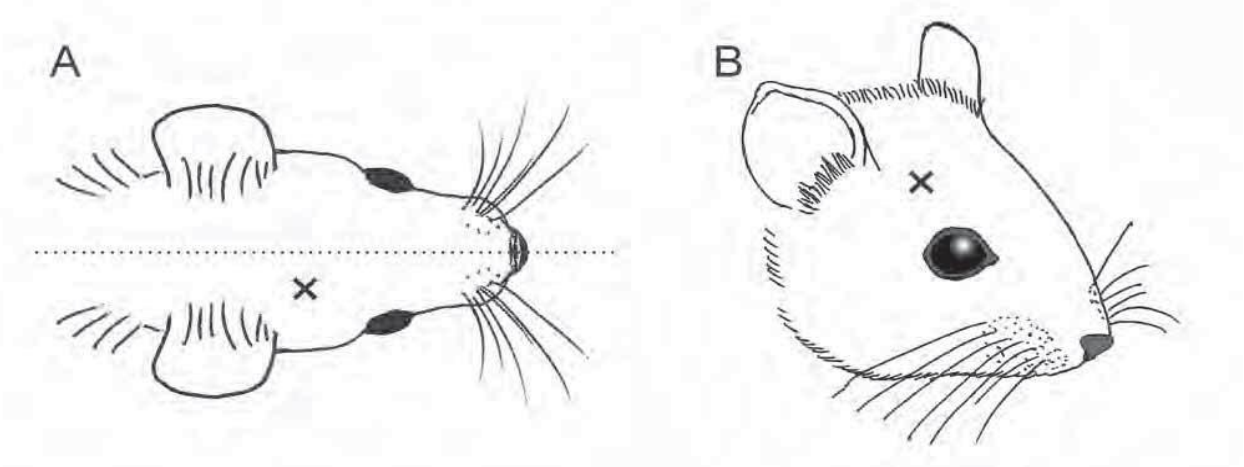


**Рис. 8. Місце інтрацеребрального інфікування білих мишей 3-4 тижневого віку (за Laboratory techniques in rabies, Fifth edition, Vol. 1, 2018)**

Спостереження за мишами проводиться щоденно протягом 30 діб. Необхідно звертати увагу на прояв клінічних ознак сказу (пригнічення, плавальні рухи, розвиток паралічів).

Кожна миша, яка загине після 5-ї доби після зараження підлягає дослідженню на сказ МФА, а отриманні результати вносяться в облікову картку. У разі необхідності подальшого типування вірусу сказу, мозок від загиблих мишей зберігати за температури мінус 70ºС.

*Результат*. Якщо протягом 30 днів миші не загинуть і не проявлять клінічних ознак сказу, результат дослідження вважається негативним. Якщо хоч одна миша загине від сказу, тобто специфічність гибелі буде підтверджено в реакції прямої імунофлуоресценції, результат вважається позитивним.

Якщо результат біологічної проби на мишах є першим позитивним результатом, тобто попередній результат дослідження цього патологічного матеріалу тестом МФА був негативним, то негайно виписується позитивний результат і про це повідомляють відповідні регіональні органи ветеринарної медицини, а також ту установу, яка надіслала патологічний матеріал на дослідження.

**2.3. Ізоляція вірусу сказу в культурі клітин.**

Ізоляція вірусу в культурі клітин – rabies tissue culture infection test (RTCIT) дає змогу виявити життєздатність (реплікацію) вірусу сказу у зразках патологічного матеріалу

Найбільш придатною культурою клітин для вірусовиділення вірусу сказу є клітини нейробластоми, клон N2a (код CCL-131 в Американській колекції культур клітин – ATCC). Ці клітини володіють найбільшою чутливістю при зараженні різними ліссавірусами. Клітини вирощують у модифікованому середовищі DMEM з 5 % фетальної сироватки крові ВРХ (FBS, або FCS) за температури 37°С з 0,5 % або 5 % $CO_2$. Для підвищення чутливості та підтвердження негативного результату клітин можна проводити додаткові пасажі [16, 17, 21, 32].

*Вимоги безпеки*. Матеріал, який надійшов на дослідження, є потенційно інфікованим, тому дослідження необхідно проводити тільки в спеціально пристосованих приміщеннях, які відповідають вимогам біобезпеки і забезпечені всіма засобами захисту персоналу, що працює в них.

Всі етапи реакції слід проводити в шафах біологічної безпеки 2-го класу. Етап фіксації ацетоном проводити в спеціальній шафі біологічної безпеки 2-го класу, призначеному для роботи з ацетоном.

Всі залишки розчинів, які містять в собі біологічні матеріали, потрібно дезінфікувати (згідно інструкцій по використанню дезінфектантів).

Слід уникати утворення аерозолів та розбризкування зразків або розчинів.

Після закінчення роботи робоче місце необхідно обробити дезінфікуючим розчином (згідно інструкцій по використанню дезінфектантів).

*Біологічні матеріали* – зразки з головного мозку від підозрілих на сказ тварин.

*Обладнання, засоби та допоміжні пристрої:* вологий інкубатор з температурою нагрівання 37°С з 5 % $CO_2$; кабінет біологічної безпеки, клас 2; люмінесцентний мікроскоп, придатний для ФІТЦ-флуоресценції, оснащений окуляром на х10 і об'єктивом на х10; загальне збільшення мікроскопу 100х або 125х внаслідок додаткового збільшення епіфлуоресцентних систем; центрифуга – вортекс; низькошвидкісна центрифуга; водяна баня з температурою нагрівання 56°С; кабінет біологічної безпеки для фіксації клітин в ацетоні, клас 2; низькотемпературна камера на мінус 80°С; піпетки автоматичні змінного об'єму на 5–1000 мкл; 96–лункові мікропанелі; одно- та багатоканальні дозатори зі змінним об'ємом на 20–300 мкл; спиртівка; ємкість для використаних піпеток і наконечників.

*Реактиви і біопрепарати*: трипсин-етилен-діамін-тетраоцтова кислота (Trypsin–EDTA (0.5%), no phenol red); фосфатно-буферний розчин (ФБР) pH 7,2 без іонів $Ca^{2+}$ і $Mg^{2+}$ (PBS, Dulbeccos W/O CA, MG (1X); рідина для фіксування клітин (ацетон ЧДА, 80 %); середовище для культури клітин Dulbecco MED W/O NA PYR high glucose; фетальна сироватка теляти (FBS); ФІТЦ – антирабічний коньюгат (FITC Anti-Rabies Globulin Kit); перещеплювана культура клітин N2a (CCL–131); спирт етиловий 70 %, спирт етиловий 96 %.

*Розхідні матеріали*: вата гігроскопічна; піпетки одноразові градуйовані; рукавички гумові; одноразові стерильні наконечники (5–200 мкл).

***Протокол постановки ІВКК (для 96–лункових мікропанелей).***

*Підготовка зразку*. Для підготовки суспензії для інфікування культури клітин необхідно відібрати шматочки амонового рогу, кори півкуль, мозочка, довгастого мозку. Приготування суспензії відбувається аналогічно БП, але готується 20 % суспензія, а до шматочків мозку додають фосфатно-сольовий буфер PBS 0,1 М, pH 7,4.

*Вирощування клітин*. Клітини N2a (CCL–131), які використовуються для вірусовиділення, трипсинізуються з моношару, який вже сформований (клітини знаходяться в експоненціальній фазі їх кінетичного росту – (2-3)-добовий моношар). В клітинній суспензії не повинно бути клітинних агрегатів для чого проводиться піпетування клітинної суспензії. Загальний об'єм клітин 2х107 клітин використовується для матрасу площею 75 $см^2$. Клітини збирають в об'ємі 20–30 мл середовища з додаванням 5 % інактивованої на водяній бані за температури 56°С протягом 30 хв фетальної сироватки крові ВРХ (FBS).

*Внесення дослідних зразків*. 100 мкл освітленого гомогенату мозку додають до 200 мкл 2×105 клітин/$см^3$ суспензії клітин (щойно пересіяної (2-3)-добової лінії клітин N2a) у чотири лунки 96-лункової мікропанелі.

*Заміна середовища*. Після 24–годинної інкубації за температури 37°С та 5 % $CO_2$ видаляють супернатант з кожної лунки за допомогою аспіраційної системи та додають у дозі 200 мкл середовища DMEM з вмістом 5 % FBS.

*Інкубування*. Інкубування за температури 37°С та 5 % $CO_2$ продовжується після заміни середовища з подальшим інкубуванням 72 год. Після чого супернатант видаляється за допомогою аспіраційної системи, або у разі необхідності подальших досліджень, або здійснення сліпого пасажування, видаляється мікропіпеткою і зберігається за температури мінус 80°С.

*Фарбування*. Після завершення інкубування лунки з клітинами промиваються фосфатно-сольовим буферним розчином, pH 7,2-7,4. Потім клітини фіксують 80 % ацетоном (охолодженим до температури мінус 20°С) впродовж 30 хв, висушують на повітрі протягом 60 хв і фарбують за температури 37°С протягом 30 хв моноклональними кон'югованими ФІТЦ антитілами в робочому розведенні згідно інструкції виробника. Видаляють флуоресціюючий кон'югат і споліскують два рази фосфатно-буферним розчином, а його залишки видаляють методом витрушуванням плашки по фільтрувальному паперу.

*Результат*. Для виявлення специфічного світіння вірусу сказу в культурі клітин використовують люмінесцентний мікроскоп, придатний для ФІТЦ-флуоресценції. Під люмінесцентним мікроскопом за збільшенні 100х оглядається уся поверхня кожної лунки. Облік реакції якісний (за наявності специфічної флуоресценції хоча б одній лунці – реакція позитивна).

Варіації постановки реакції можуть бути в скороченні часу інкубації перед зміною середовища для зменшення клітинної токсичності, використання засобів, що підвищують проникності клітин для вірусу (наприклад, DEAE-декстран) та сліпе пасажування до трьох разів для збільшення чутливості.

**2.4. Полімеразна ланцюгова реакція.**

Полімеразна ланцюгова реакція – метод молекулярної біології, який дає можливість накопичити певну специфічну ділянку ДНК/ РНК до детектуючого рівня.

В основі діагностики інфекційних хвороб методом ПЛР лежить виявлення в попередньовиділеному зразку нуклеїнових кислот (НК) специфічної для досліджуваного збудника інфекційної хвороби ділянки НК шляхом багаторазового синтезу цієї ділянки НК за допомогою ферментів, праймерів та нуклеотидів у відповідному хімічному середовищі та за оптимальних температурних режимів. Перед ампліфікацією РНК перетворюють в комплементарну ДНК (кДНК) за допомогою ферменту ревертази або ДНК-полімерази, яка володіє ревертазною властивістю. Даний процес називається зворотною (реверс) транскрипцією. Зазвичай реверс транскрипцію та ПЛР проводять в одній пробірці.

На даний час розроблені протоколи постановки методу ПЛР досягли чутливості та специфічності також рівня як і МФА (98-100 %), тому ПЛР може бути використана, як альтернатива методу МФА.

**Загальні положення.**

*Вимоги до організації роботи у молекулярно-генетичній лабораторії.*

Принципи організації лабораторії та етапи проведення молекулярно-генетичних досліджень, а також робота персоналу лабораторії, де проводяться дослідження молекулярно-генетичними методами регламентуються Державними санітарними нормами і правилами 9.9.5-153-2008 «Організація роботи лабораторій при дослідженні матеріалу, що містить біологічні патогенні агенти I-IV груп патогенності молекулярно-генетичними методами» та ДСТУ 6051:2008 «Ветеринарна медицина. ПЛР-лабораторія для молекулярної діагностики. Загальні вимоги».

Відповідно до вищезазначених нормативних документів ПЛР-лабораторія в залежності від способу детекції результатів реакції повинна включати наступний набір розташованих окремо робочих зон або окремо виділених робочих зон у складі інших функціональних приміщень:

• Робоча зона 1 – прийому, реєстрації і первинної обробки матеріалу.

• Робоча зона 2 – виділення НК.

• Робоча зона 3 – приготування реакційних сумішей.

• Робоча зона 4 – проведення ПЛР–ампліфікації.

• Робоча зона 5 – детекції продуктів ампліфікації (при застосуванні методів електрофорезу) – форезна, а також секвенування – секвенаторна.

Зональність ПЛР-лабораторії має забезпечувати поточність руху (односпрямований рух) досліджуваного матеріалу, зразків НК, продуктів ампліфікації. При цьому передачу досліджуваного матеріалу до Робочої зони 1 та зразків при суміжному розташуванні приміщень Робочих зон 1, 2, 3, 4 бажано здійснювати через шлюзові передавальні вікна.

Кожна робоча зона ПЛР-лабораторії повинна мати свій промаркований набір меблів, обладнання, автоматичних піпеток, наконечників, пластикового та

скляного посуду, захисного одягу, гумових рукавичок, інвентарю для прибирання тощо, які використовують тільки в даному приміщенні.

Мінімальний перелік основного обладнання ПЛР-лабораторії:

–робоча зона 1: шафа біологічної безпеки II або III класу, гомогенізатор для патологічного матеріалу, високошвидкісна центрифуга (13 тис об/хв або більше) з охолодженням для пробірок об'ємом 1,5-2 мл, мініцентрифуга-струшувач для пробірок об'ємом 1,5-2 мл, набір одноканальних дозаторів зі змінними об'ємами (0,5-10 мкл; 2-20 мкл, 10-100 мкл; 20-200 мкл; 100-1000 мкл), холодильник з морозильною камерою (-20°С) для короткострокового зберігання патологічного матеріалу, морозильна камера (мінус 80°С) для довгострокового зберігання патологічного матеріалу;

–робоча зона 2: шафа біологічної безпеки II або III класу, термострушувач (зі змінною температурою та частотою струшування) для пробірок об’ємом 1,5-2 мл, високошвидкісна центрифуга (13 тис. об/хв або більше) з охолодженням для пробірок об’ємом 1,5-2 мл, мініцентрифуга-струшувач для пробірок об’ємом 1,5-2 мл, набір одноканальних дозаторів зі змінними об’ємами (0,5-10 мкл; 2-20 мкл, 10-100 мкл; 20-200 мкл; 100-1000 мкл), холодильник з морозильною камерою (мінус 20°С) для зберігання компонентів діагностичних наборів, лабораторний відсмоктувач;

–робоча зона 3: два ПЛР-бокси (один для приготування мастерміксу, другий для внесення дослідних зразків НК в реакційну суміш), мініцентрифуга-струшувач для пробірок об’ємом 1,5-2 мл, мініцентрифуга-струшувач для стріпованих (у кількості 8 шт.) пробірок об’ємом 0,1-0,2 мл, набір одноканальних дозаторів зі змінними об’ємами (0,5-10 мкл; 2-20 мкл, 10-100 мкл; 20-200 мкл; 100-1000 мкл), холодильник з морозильною камерою (мінус 20°С) для короткострокового зберігання зразків виділених нуклеїнових кислот, морозильна камера (мінус 20°С) для зберігання діагностичних наборів.

–робоча зона 4: ампліфікатори для проведення звичайної ПЛР та ПЛР у режимі реального часу.

–робоча зона 5: ПЛР-бокс, ампліфікатор для проведення звичайної ПЛР, обладнання для проведення електрофорезу з системою документації, спектрофотометр, центрифуга, вортекс, секвенатор, мікрохвильова піч, холодильник з морозильною камерою.

**Увага!** Для роботи з НК використовують тільки одноразові стерильні пластикові матеріали, що мають спеціальне маркування «RNase-free» «DNase-free». Працюють тільки в одноразових рукавичках. Всі маніпуляції, пов’язані з підготовкою зразків, проводяться дозаторами змінних об’ємів із використанням одноразових поліпропіленових пробірок та наконечників з аерозольним бар’єром. Одноразовий пластиковий посуд (пробірки, наконечники) повинні скидатись у спеціальний контейнер з хлорвмісним дезінфікуючим розчином.

Після 3-годинної дезінфекції розчин виливають у каналізацію, а відпрацьований пластик автоклавують при 1 Атм, протягом 30 хв та відправляють на перероблення у спеціалізовані підприємства.

Після проведення досліджень дозатори, лабораторне обладнання та робочі поверхні рекомендовано обробляти розчинами для видалення ДНК/РНК.

Рекомендується опромінювати приміщення ультрафіолетом протягом 1 год до початку та 1 год після закінчення робіт.

*Контролі ПЛР:*

Негативний контроль виділення (НКВ) – зразок, виділення ДНК/РНК з якого проводиться як із дослідних зразків, однак замість дослідного зразка додається деіонізована вода вільна від нуклеаз. Використовується для виявлення контамінації досліджуваних зразків між собою.

Внутрішні позитивний контроль (ВПК) – ДНК/РНК, послідовність нуклеотидів якої відрізняється від послідовності нуклеотидів ДНК/РНК збудника інфекції, на виявлення якого проводиться дослідження, і яка обов'язково має бути присутньою в дослідному зразку. ВПК використовується з метою контролю правильності виділення НК та контролю інгібіції ПЛР. Розрізняють екзогенний та ендогенний ВПК.

В якості екзогенного ВПК використовується ДНК/РНК, яка за нормальних умов не може бути присутньою в дослідному зразку, наприклад, штучносинтезована ДНК/РНК, або ДНК/РНК вірусів рослин (вразі дослідженні зразків від тварин).

Ендогенний ВПК – ДНК/РНК, яка вже присутня в дослідному зразку, наприклад гени, які постійно експресуються в різних тканинах, є важливими для забезпечення життєдіяльності клітини і є консервативними у різних видів тварин (наприклад, ген β-актину).

- Позитивний контроль ампліфікації (ПКА) – зразок, який містить порогову концентрацію цільової ДНК/РНК і при цьому стабільно виявляється. ПКА дає змогу контролювати правильність приготування реакційної суміші та якість реактивів.
- Негативний контроль ампліфікації (НКА) – зразок, який не містить ДНК/РНК. НКА дає змогу виявити контамінацію реактивів НК.
- Позитивний зразок (ПЗ) – зразок, який завідомо містить цільову послідовність ДНК/РНК, використовується для контролю всіх етапів ПЛР.
- Негативний зразок (НЗ) – зразок, який не містить цільової послідовності ДНК/РНК, але містить саму ДНК/РНК.

НКВ, ПКА, НКА є обов'язковими та повинні використовуватися при кожній постановці ПЛР.

***Контамінація дослідних зразків та реактивів.***

*Види контамінації:*

–перехресна контамінація від одного дослідного зразка до іншого – під час підготовки зразків до дослідження, виділення НК, внесення зразків в реакційну суміш;

–контамінація НК від попередніх зразків;

–контамінація продуктами ампліфікації (ампліконами) – має найбільше значення, оскільки амплікони в процесі ПЛР накопичуються у великій кількості і є ідеальним продуктом для реампліфікації;

–контамінація досліджуваного матеріалу.

*Основні правила попередження контамінації:*

–одноразовий лабораторний одяг в кожній лабораторній зоні;

–одноразові перчатки без тальку;

–накінечники з аерозольними фільтрами;

–одноразові пластикові пробірки та посуд;

–дотримання поточності руху досліджуваних зразків.

–хімічна та ультрафіолетова дезінфекція всіх поверхонь робочих зон.

Контроль оточуючого середовища, що дає змогу виявити контамінацію робочих поверхонь, приладів та обладнання нуклеїновими кислотами. Для цього відбираються мазки з робочих поверхонь та обладнання, яке використовувалося у дослідженнях, і проводяться дослідження на інфекційні захворювання, геноми збудників яких попередньо виявлялися. Проводять не рідше одного разу на 3 місяці або при підозрі на контамінацію.

*Дії при контамінації:*

• Утилізація всіх дослідних зразків на проміжних стадіях дослідження.

• Генеральне прибирання, хімічна і ультрафіолетова дезінфекція усіх поверхонь лабораторного приміщення.

• Дезінфекція меблів, робочих поверхонь приладів і обладнання.

• Контроль оточуючого середовища щодо контамінації.

***Відновлення та розведення праймерів.***

Праймери поставляються в леофільновисушеному вигляді. Пред першим використанням леофільновисушені праймери необхідно відновити до концентрації 100 мкМ (матрична концентрація) шляхом додавання ТЕ буфера в об'ємі, що вказаний в паспорті до праймерів. З матричної концентрації готують робочу концентрацію праймерів, що становить 20 мкМ. Матричну та робочу концентрацію праймерів зберігають за температури не вище мінус 16°С. Оскільки праймери не можна заморожувати-розморожувати більше 5-ти разів, праймери в робочій концентрації слід розділити на аліквоти.

**Відбір, транспортування та зберігання зразків патологічного/біологічного матеріалу.**

Відбір зразків частин головного мозку для дослідження методом ПЛР та їх транспортування до лабораторії здійснюють так само як і для інших методів дослідження. Зразки з ознаками автолізу до дослідження не допускаються.

Зразки направляють до лабораторії впродовж 24 год.

Зразки зберігають за температури 2-8°С протягом 12 год, за температури від –16 до –24°С протягом тижня, за температури –70°С і нижче – тривалий час.

**Підготовлення зразків до виділення РНК.**

Підготовка зразків для дослідження проводиться в Робочій зоні 1 – прийому, реєстрації і первинної обробки матеріалу.

Із зразку головного мозку готують 10-20 % суспензію. Для цього з усіх відділів головного мозку відрізають маленькі шматки, використовуючи стерильні ножиці та пінцет, і переносять приблизно 100-200 мг матеріалу в стерильну пробірку, яка містить кульку із нержавіючої сталі, додають 800-900 мкл стерильного фізіологічного розчину або ФБР і гомогенізують при 30 Гц протягом 3 хв. У разі відсутності гомогенізатора можна використовувати стерильну фарфорову ступку з товкачиком. Пробірку з гомогенізатом центрифугують протягом 2 хв при 15000 × g. Для екстракції РНК використовують супернатант.

Для часткової інактивації вірусу сказу гомогенізат прогрівають при температурі 56°С протягом 30 хв.

**Виділення РНК.**

Виділення РНК із досліджуваного матеріалу проводиться в Робочій зоні 2 – виділення НК.

Метою даного етапу є виділення РНК з клітин, очищенні її від білків, жирів, вуглеводів та дезактивації клітинних ферментів. Процес виділення РНК складається з наступних етапів:

–лізування (під час даного етапу відбувається руйнування мембран клітин та ядер, вихід РНК в розчин, звільнення її від білків та дезактивація клітинних ферментів);

–адсорбція РНК (зв'язування РНК з адсорбуючою речовиною, яка може знаходитися у вигляді суспензії, мембрани фільтрувальних колонок, або на поверхні магнітних частинок, в залежності від набору, який використовується для виділення НК);

–відмивання (відмивання РНК від білків, жирів, вуглеводів і залишків клітинних мембран);

–елюція (відокремлення РНК від адсорбуючої речовини і перехід РНК в розчин).

Враховуючи молекулярну нестабільність РНК, з нею необхідно поводитись обережно. Виділену РНК зберігають при температурі від 2 до 8°С до 4 год, при температурі не вище мінус 16°С – протягом місяця, і більш тривало – при температурі не вище мінус 68°С, слід мінімізувати кількість циклів замороження-розмороження.

Для екстракції РНК із дослідних зразків використовують комерційні набори для виділення РНК, або РНК/ДНК. Рекомендовано використовувати набори призначенні для виділення РНК з тканин, які містять багато жирової тканини.

**Виявлення РНК вірусу сказу методом ПЛР.**

**Виявлення РНК вірусів роду *Lyssavirus* SYBR Green ЗТ-ПЛР-РЧ.**

Даний протокол дає можливість ампліфікувати і виявити ампліфікацію фрагмента (110 пн) N гену усіх визнаних ICTV видів ліссавірусів. Протокол розроблений Wakeley та ін. [18, 30] Також даний протокол паралельно дає можливість виявляти фрагмент (153 пн) мРНК β-актину, яка слугує ендогенним ВПК.

***Реагенти*:**

- Вода вільна від нуклеаз;
- Набір QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (Qiagen, каталожний номер: 204243);
- Послідовність нуклеотидів праймерів:

***N ген***

–прямий – JW12: 5′- ATGTAACACCYCTACAATG -3′

–зворотний – N165-146: 5′- GCAGGGTAYTTRTACTCATA -3′

***β актин***

–прямий – Beta actin_int: 5′-CGATGAAGATCAARTCATTGC-3′

–зворотний – Beta actin_rev: 5′-AAAGCATTTGCGGTGGAC-3′

*Постановка SYBR Green ЗТ-ПЛР-РЧ*

1. Підрахувати необхідну кількість реакцій з урахуванням кількості досліджуваних зразків і контролів та підготувати для них пробірки/лунки плашки.

2. Розморозити всі компоненти набору, змішати шляхом вортексування і центрифугувати для осадження крапель реактивів з кришок пробірок.

3. Приготувати реакційну суміш для виявлення РНК вірусів роду *Lyssavirus* на попередньо підраховану кількість реакцій з врахуванням додаткових 10 % від загального об'єму, необхідних для компенсації втрати реагентів під час приготування реакційної суміші (згідно табл. 2). Реакційну суміш готують в ПЛР боксі призначеному для приготування реакційної суміші.

*Таблиця 2*

**Приготування реакційної суміші для виявлення РНК вірусів роду *Lyssavirus***

| № п/п | Назва реактиву | Початкова концентрація | Фінальна концентрація | мкл на реакцію |
|---|---|---|---|---|
| 1 | Вода вільна від нуклеаз | - | - | 8,75 |
| 2 | 2× QuantiTect SG Master Mix | 2× | 1× | 12,5 |
| 3 | Прямий праймер JW12 | 20 мкМ | 0,6 мкМ | 0,75 |
| 4 | Зворотний праймер N165-146 | 20 мкМ | 0,6 мкМ | 0,75 |
| 5 | QuantiTect RT Mix | - | - | 0,25 |
| Загальний об'єм суміші | | | | **23,0** |

5. Змішати реакційну суміш на вортексі і центрифугувати для осадження крапель реакційної суміші з кришки пробірки.

6. В кожну підготовлену пробірку/лунку плашки внести по 23 мкл реакційної суміші.

7. Приготувати реакційну суміш для виявлення мРНК β-актину на попередньо підраховану кількість реакцій з врахуванням додаткових 10 % від загального об'єму, необхідних для компенсації втрати реагентів під час приготування реакційної суміші (табл. 3). Реакційну суміш готують в ПЛР боксі призначеному для приготування реакційної суміші.

*Таблиця 3*

**Приготування реакційної суміші для виявлення мРНК β-актину.**

| № п/п | Назва реактиву | Початкова концентрація | Фінальна концентрація | мкл на реакцію |
|---|---|---|---|---|
| 1 | Вода вільна від нуклеаз | - | - | 8,75 |
| 2 | 2× QuantiTect SG Master Mix | 2× | 1× | 12,5 |
| 3 | Прямий праймер Beta actin_int | 20 мкМ | 0,6 мкМ | 0,75 |
| 4 | Зворотний праймер Beta actin_rev | 20 мкМ | 0,6 мкМ | 0,75 |
| 5 | QuantiTect RT Mix | - | - | 0,25 |
| Загальний об'єм суміші | | | | **23,0** |

8. Змішати реакційну суміш на вортексі і центрифугувати для осадження крапель реакційної суміші з кришки пробірки.

9. В кожну підготовлену пробірку/лунку плашки внести по 23 мкл реакційної суміші.

10. Внести по 2 мкл РНК дослідних зразків та НКВ у відповідні пробірки/лунки плашки реакційною сумішшю для виявлення РНК вірусів роду

*Lyssavirus*. Внесення дослідних зразків та контролів у реакційну суміш проводять у ПЛР боксі призначеному для внесення дослідних зразків у реакційну суміш.

11. Внести 2 мкл НКА (вода вільна від нуклеаз) у відповідну пробірку/лунку плашки з реакційною сумішшю для виявлення РНК вірусів роду *Lyssavirus*.

12. Внести 2 мкл ПКА у відповідну пробірку/лунку плашки з реакційною сумішшю для виявлення РНК вірусів роду *Lyssavirus*.

13. Внести по 2 мкл РНК дослідних зразків та НКВ у відповідні пробірки/лунки плашки реакційною сумішшю для виявлення мРНК β-актину. Внесення дослідних зразків та контролів у реакційну суміш проводять у ПЛР боксі призначеному для внесення дослідних зразків у реакційну суміш.

14. Внести 2 мкл НКА (вода вільна від нуклеаз) у відповідну пробірку/лунку плашки з реакційною сумішшю для виявлення мРНК β-актину.

15. Внести 2 мкл ПКА у відповідну пробірку/лунку плашки з реакційною сумішшю для виявлення мРНК β-актину.

16. Центрифугувати пробірки/плашку при низькій швидкості для осадження внесених зразків на дно пробірок/лунок плашки і змішування їх з реакційною сумішшю.

17. Помістити пробірки/плашку із зразками в ампліфікатор.

18. Запустити програмне забезпечення ампліфікатора і встановити наступні параметри ампліфікації (табл. 4):

Об’єм суміші: 25 мкл.

*Таблиця 4*

**Параметри ампліфікації.**

| Етап | | Режим | Кількість циклів |
|---|---|---|---|
| 1. Утримування | Зворотна транскрипція | 50°C − 30 хв | 1 |
| 2. Утримування | Ініціалізація | 95°C − 15 хв | 1 |
| 3. Циклювання | Денатурація | 94°C − 30 с | 45 |
| | Відпал | 55°C − 30 с | |
| | Елонгація | 72°C − 30 с детекція (FAM) | |
| 4. | Крива плавлення | Набір температури з 65°C до 95°C, підвищення температури на 1°C на кожному кроці, очікування 5 с. на кожному кроці | |

***Облік та інтерпретація результатів.***

Облік результатів ампліфікації проводять за допомогою програмного забезпечення ампліфікатора. Інтерпретацію результатів ампліфікації досліджуваних зразків проводять після отримання коректних результатів контролів (ПКА повинен бути позитивним, НКВ та НКА - негативним).

Зразок вважать позитивним на сказ (виявлено РНК вірусу сказу), якщо в ньому спостерігається накопичення інтенсивності флуоресценції по каналу FAM/SYBR/Green, температура плавлення характерна для даної довжини і послідовності нуклеотидів фрагмента кДНК (≈ 79°C).

Зразок вважать негативним на сказ (не виявлено РНК вірусу сказ), якщо в ньому не спостерігається накопичення інтенсивності флуоресценції по каналу FAM/SYBR/Green, при цьому спостерігається накопичення інтенсивносні флуоресценції по каналу FAM/SYBR/Green, у реакції по виявленню мРНК β-

актину, температура плавлення характерна для даної довжини і послідовності нуклеотидів фрагмента кДНК (≈ 86°С).

**Виявлення РНК вірусів роду *Lyssavirus* ЗТ-ПЛР-РЧ (n)LN34**

Даний протокол дає можливість ампліфікувати і виявити ампліфікацію фрагмента N гену вірусів роду Lyssavirus та мРНК β-актину, яка слугує ендогенним внутрішнім позитивним контролем [14].

***Реагенти*:**

• Вода вільна від нуклеаз;

• Набір AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Reagents (Applied Biosystems, каталожний номер: AM1005);

• Послідовність нуклеотидів праймерів та зондів:

***N ген***

FW 1m 5′-ACGCTTAACAACMARATCAAAGAA-3′
FW 2m 5′-ACGCTTAACAACAAAATCADARAAG-3′
FW 3 5′-ACGCTTAACGACAAAAHCAGARAAG-3′
FW 4 5′-ACGCTTAACAGCTAAAAACYAGAAG-3′
FW 5 5′-ACGCTTAACARCAAAATCTTATAAG-3′
REV 1 5′-CMGGGTAYTTRTAYTCATAYTGRTC-3′
REV 2 5′-CTGGATATTTGTAYTCATAYTGATC-3′
REV 3 5′-CAGGATATTTATATTCATACTGGTC-3′
LN 34 FAM- AACACCYCTACAATGGA-BHQ1
LN 34lago FAM- AACACTACTACAATGGA-BHQ1

***B-актин***

Beta Actin FW 5′-CGATGAAGATCAAGATCATTGC-3′
Beta Actin 5′-AAGCATTTGCGGTGGAC-3′
Beta Actin probe FAM- TCCACCTTCCAGCAGATGTGGATCA-BHQ1

*Таблиця 5*

**Приготування попередньої суміші праймерів.**

| Назва суміші | Склад | Початкова концентрація | Кінцева концентрація |
|---|---|---|---|
| Суміш праймерів LN34 FW | LN34 FW 1m | 100 мкМ | 20 мкМ |
| | LN34 FW 2m | 100 мкМ | |
| | LN34 FW 3 | 100 мкМ | |
| | LN34 FW 4 | 100 мкМ | |
| | LN34 FW 5 | 100 мкМ | |
| Суміш праймерів LN34 REV | LN34 REV 1 | 100 мкМ | 20 мкМ |
| | LN34 REV 2 | 100 мкМ | |
| | LN34 REV 3 | 100 мкМ | |
| Суміш зондів LN34 та LN34 lago | LN34 | 100 мкМ | 5 мкМ |
| | LN34 lago | 100 мкМ | |
| Beta Actin FW | Beta Actin FW | 100 мкМ | 10 мкМ |
| Beta Actin REV | Beta Actin REV | 100 мкМ | 10 мкМ |
| Beta Actin probe | Beta Actin probe | 100 мкМ | 5 мкМ |

*Постановка ЗТ-ПЛР-РЧ*

1. Підрахувати необхідну кількість реакцій з урахуванням кількості досліджуваних зразків і контролів та підготувати для них пробірки/лунки плашки.

2. Розморозити всі компоненти набору, змішати шляхом вортексування і центрифугувати для осадження крапель реактивів з кришок пробірок.

3. Приготувати реакційну суміш для виявлення РНК вірусів роду *Lyssavirus* на попередньо підраховану кількість реакцій з врахуванням додаткових 10 % від загального об'єму, необхідних для компенсації втрати реагентів під час приготування реакційної суміші (табл. 6). Реакційну суміш готують в ПЛР боксі призначеному для приготування реакційної суміші.

*Таблиця 6*

**Приготування реакційної суміші для виявлення РНК вірусів роду *Lyssavirus***

| № п/п | Назва реактиву | Початкова концентрація | Фінальна концентрація | мкл на реакцію |
|---|---|---|---|---|
| 1 | Вода вільна від нуклеаз | - | - | 6,5 |
| 2 | RT-PCR Buffer | 2× | 1× | 12,5 |
| 3 | Суміш праймерів LN34 FW | 20 мкМ | 0,8 мкМ | 1 |
| 4 | Суміш праймерів LN34 REV | 20 мкМ | 0,8 мкМ | 1 |
| 5 | Суміш зондів LN34 та LN34 lago | 5 мкМ | 0,2 мкМ | 1 |
| 6 | RT-PCR Enzyme mix | 25× | 1× | 1 |
| Загальний об'єм суміші | | | | **23,0** |

5. Змішати реакційну суміш на вортексі і центрифугувати для осадження крапель реакційної суміші з кришки пробірки.

6. В кожну підготовлену пробірку/лунку плашки внести по 23 мкл реакційної суміші.

7. Приготувати реакційну суміш для виявлення мРНК β-актину на попередньо підраховану кількість реакцій з врахуванням додаткових 10 % від загального об'єму, необхідних для компенсації втрати реагентів під час приготування реакційної суміші (табл. 7). Реакційну суміш готують в ПЛР боксі призначеному для приготування реакційної суміші.

8. Змішати реакційну суміш на вортексі і центрифугувати для осадження крапель реакційної суміші з кришки пробірки.

9. В кожну підготовлену пробірку/лунку плашки внести по 23 мкл реакційної суміші.

10. Внести по 2 мкл РНК дослідних зразків та НКВ у відповідні пробірки/лунки плашки реакційною сумішшю для виявлення виявлення РНК вірусів роду *Lyssavirus*. Внесення дослідних зразків та контролів у реакційну суміш проводять у ПЛР боксі призначеному для внесення дослідних зразків у реакційну суміш.

11. Внести 2 мкл НКА (вода вільна від нуклеаз) у відповідну пробірку/лунку плашки з реакційною сумішшю для виявлення РНК вірусів роду *Lyssavirus*.

12. Внести 2 мкл ПКА у відповідну пробірку/лунку плашки з реакційною сумішшю для виявлення РНК вірусів роду *Lyssavirus*.

*Таблиця 7*

**Приготування реакційної суміші для виявлення мРНК β-актину**

| № п/п | Назва реактиву | Початкова концентрація | Фінальна концентрація | мкл на реакцію |
|---|---|---|---|---|
| 1 | Вода вільна від нуклеаз | - | - | 6,5 |
| 2 | RT-PCR Buffer | 2× | 1× | 12,5 |
| 3 | Beta Actin FW | 10 мкМ | 0,4 мкМ | 1 |
| 4 | Beta Actin REV | 10 мкМ | 0,4 мкМ | 1 |
| 5 | Beta Actin probe | 5 мкМ | 0,2 мкМ | 1 |
| 6 | RT-PCR Enzyme mix | 25× | 1× | 1 |
| Загальний об'єм суміші | | | | **23,0** |

13. Внести по 2 мкл РНК дослідних зразків та НКВ у відповідні пробірки/лунки плашки реакційною сумішшю для виявлення мРНК β-актину. Внесення дослідних зразків та контролів у реакційну суміш проводять у ПЛР боксі призначеному для внесення дослідних зразків у реакційну суміш.

14. Внести 2 мкл НКА (вода вільна від нуклеаз) у відповідну пробірку/лунку плашки з реакційною сумішшю для виявлення мРНК β-актину.

15. Внести 2 мкл ПКА у відповідну пробірку/лунку плашки з реакційною сумішшю для виявлення мРНК β-актину.

16. Центрифугувати пробірки/плашку при низькій швидкості для осадження внесених зразків на дно пробірок/лунок плашки і змішування їх з реакційною сумішшю.

17. Помістити пробірки/плашку із зразками в ампліфікатор.

18. Запустити програмне забезпечення ампліфікатора і встановити наступні параметри ампліфікації (табл. 8):

Об'єм суміші: 25 мкл

*Таблиця 8*

**Параметри ампліфікації**

| Етап | | Режим | Кількість циклів |
|---|---|---|---|
| 1. Утримування | Зворотна транскрипція | 50°C − 30 хв | 1 |
| 2. Утримування | Ініціалізація | 95°C − 10 хв | 1 |
| 3. Циклювання | Денатурація | 95°C − 15 с | 45 |
| | Відпал | 56°C − 30 с | |
| | Елонгація | 72°C − 30 с детекція (FAM) | |

***Облік та інтерпретація результатів.***

Облік результатів ампліфікації проводять за допомогою програмного забезпечення ампліфікатора. Інтерпретацію результатів ампліфікації

досліджуваних зразків проводять після отримання коректних результатів контролів (ПКА повинен бути позитивним, НКВ та НКА - негативним) (табл. 9).

*Таблиця 9*

**Оцінка результатів ЗТ-ПЛР-РЧ.**

| Ціль | Значення Ct | Результат | Інтерпретація |
|---|---|---|---|
| мРНК β-актину | <33 | Позитивний | Додаткових дій вживати не потрібно |
| | 33-45 | Сумнівний | Можливе інгібування або недостатня кількість зразка. Необхідно повторити дослідження або провести дослідження іншими методами |
| | відсутнє значення | Результати дослідження не можна враховувати | Недостатня кількість зразка або не правильно було проведено виділення РНК. Необхідно повторити дослідження або провести дослідження іншими методами |
| РНК вірусів роду *Lissavirus* | <35 | Позитивний | Додаткових дій вживати не потрібно |
| | 35-45 | Сумнівний | Необхідно повторити дослідження або провести дослідження іншими методами |
| | відсутнє значення | Негативний або сумнівний | Негативний, якщо значення Ct для β-актину ≤33 і >0. Сумнівний, якщо якщо значення Ct для β>33 або 0 |

**Виявлення РНК класичного вірусу сказу, Європейського ліссавірусу кажанів 1-го та 2-го типів методом ЗТ-ПЛР-РЧ.**

Даний протокол дає можливість ампліфікувати і виявити ампліфікацію фрагмента N гену класичного вірусу сказу (RABV), Європейського ліссавірусу кажанів 1-го (EBLV-1) та 2-го (EBLV-2) типів із використанням праймерів, які використовуються для виявлення вірусів роду *Lyssavirus* та специфічних зондів Gt1, Gt5, Gt6. Протокол розроблений Wakeley та ін. [30].

***Реагенти*:**

- Вода вільна від нуклеаз;
- Набір QuantiTect Probe RT-PCR Kit (Qiagen, каталожний номер: 204443);
- Послідовність нуклеотидів праймерів:

- Прямий – **JW12**: 5′- ATGTAACACCYCTACAATG -3′
- Зворотний – **N165-146**: 5′- GCAGGGTAYTTRTACTCATA -3′

*Послідовність нуклеотидів зондів:*

Lys-GT1 (RABV) FAM-ACAAGATTGTATTCAAAGTCAATAATCAG-BHQ1
Lys-GT5 (EBLV-1) HEX-AACARGGTTGTKTTYAAGGTCCATAA-BHQ1
Lys-GT6 (EBLV-2) Cy5-ACARAATTGTCTTCAARGTCCATAAYCAG-BBQ

**Постановка ЗТ-ПЛР-РЧ.**

1. Підрахувати необхідну кількість реакцій з урахуванням кількості досліджуваних зразків і контролів та підготувати для них пробірки/лунки плашки.

2. Розморозити всі компоненти набору, змішати шляхом вортексування і центрифугувати для осадження крапель реактивів з кришок пробірок.

3. Приготувати реакційну суміш для виявлення РНК RABV на попередньо підраховану кількість реакцій з врахуванням додаткових 10 % від загального об’єму, необхідних для компенсації втрати реагентів під час приготування реакційної суміші (табл. 10). Реакційну суміш готують в ПЛР боксі призначеному для приготування реакційної суміші.

*Таблиця 10*

**Приготування реакційної суміші для виявлення РНК RABV**

| № п/п | Назва реактиву | Початкова концентрація | Фінальна концентрація | мкл на реакцію |
|---|---|---|---|---|
| 1 | Вода вільна від нуклеаз | - | - | 7,125 |
| 2 | 2× QuantiTect Probe Master Mix | 2× | 1× | 12,5 |
| 3 | $MgCl_2$ | 25 мМ | 5 мМ | 1 |
| 4 | Прямий праймер JW12 | 20 мкМ | 0,8 мкМ | 1 |
| 5 | Зворотний праймер N165-146 | 20 мкМ | 0,8 мкМ | 1 |
| 6 | Зонд Lys-GT1 | 20 мкМ | 0,1 мкМ | 0,125 |
| 7 | QuantiTect RT Mix | - | - | 0,25 |
| Загальний об'єм суміші | | | | **23,0** |

5. Змішати реакційну суміш на вортексі і центрифугувати для осадження крапель реакційної суміші з кришки пробірки.

6. В кожну підготовлену пробірку/лунку плашки внести по 23 мкл реакційної суміші.

7. Приготувати реакційну суміш для виявлення РНК EBLV-1 на попередньо підраховану кількість реакцій з врахуванням додаткових 10 % від загального об'єму, необхідних для компенсації втрати реагентів під час приготування реакційної суміші (табл. 11). Реакційну суміш готують в ПЛР боксі призначеному для приготування реакційної суміші.

*Таблиця 11*

**Приготування реакційної суміші для виявлення РНК EBLV-1**

| № п/п | Назва реактиву | Початкова концентрація | Фінальна концентрація | мкл на реакцію |
|---|---|---|---|---|
| 1 | Вода вільна від нуклеаз | - | - | 7,625 |
| 2 | 2× QuantiTect Probe Master Mix | 2× | 1× | 12,5 |
| 3 | $MgCl_2$ | 25 мМ | 5 мМ | 1 |
| 4 | Прямий праймер JW12 | 20 мкМ | 0,6 мкМ | 0,75 |
| 5 | Зворотний праймер N165-146 | 20 мкМ | 0,6 мкМ | 0,75 |
| 6 | Зонд Lys-GT5 | 20 мкМ | 0,1 мкМ | 0,125 |
| 7 | QuantiTect RT Mix | - | - | 0,25 |
| Загальний об'єм суміші | | | | **23,0** |

8. Змішати реакційну суміш на вортексі і центрифугувати для осадження крапель реакційної суміші з кришки пробірки.

9. В кожну підготовлену пробірку/лунку плашки внести по 23 мкл реакційної суміші.

10. Приготувати реакційну суміш для виявлення РНК EBLV-2 на попередньо підраховану кількість реакцій з врахуванням додаткових 10 % від загального об'єму, необхідних для компенсації втрати реагентів під час приготування реакційної суміші (табл. 12). Реакційну суміш готують в ПЛР боксі призначеному для приготування реакційної суміші.

*Таблиця 12*

**Приготування реакційної суміші для виявлення EBLV-2.**

| № п/п | Назва реактиву | Початкова концентрація | Фінальна концентрація | мкл на реакцію |
|---|---|---|---|---|
| 1 | Вода вільна від нуклеаз | - | - | 6,875 |
| 2 | 2× QuantiTect Probe Master Mix | 2× | 1× | 12,5 |
| 3 | $MgCl_2$ | 25 мМ | 5 мМ | 1 |
| 4 | Прямий праймер JW12 | 20 мкМ | 0,9 мкМ | 1,125 |
| 5 | Зворотний праймер N165-146 | 20 мкМ | 0,9 мкМ | 1,125 |
| 6 | Зонд Lys-GT5 | 20 мкМ | 0,1 мкМ | 0,125 |
| 7 | QuantiTect RT Mix | - | - | 0,25 |
| Загальний об'єм суміші | | | | **23,0** |

11. Змішати реакційну суміш на вортексі і центрифугувати для осадження крапель реакційної суміші з кришки пробірки.

12. В кожну підготовлену пробірку/лунку плашки внести по 23 мкл реакційної суміші.

13. Додають по 2 мкл дослідних зразків та контролів (табл. 13).

*Таблиця 13*

**Схема внесення дослідних зразків та контролів**

| | **Зразок** | **RABV** | **EBLV-1** | **EBLV-1** |
|---|---|---|---|---|
| **1** | **2** | **3** | **4** | **5** |
| **Досліджуваний зразок** | Попередній статус зразку: негативний/ невідомий | Дослідження зразку у 3-х повторах | Дослідження зразку у 3-х повторах | Дослідження зразку у 3-х повторах |
| | Попередній статус зразку: негативний/ невідомий | Дослідження зразку у 2-х повторах | Дослідження зразку у 2-х повторах | Дослідження зразку у 2-х повторах |
| **НКА** | $H_2O$ | Дослідження зразку у 3-х повторах | Дослідження зразку у 3-х повторах | Дослідження зразку у 3-х повторах |
| **НЗ** | Неінфікована, осаджена суспензія головного мозку (наприклад, миші, птиці) | Дослідження зразку у 3-х повторах | Дослідження зразку у 3-х повторах | Дослідження зразку у 3-х повторах |
| **ПЗ** | Суспензія головного мозку штучно контамінована CVS (порогова концентрація) | Дослідження зразку у 2-х повторах | – | – |

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|---|---|---|---|
| **ПКА** | Синтетична РНК CVS (порогова концентрація) | Дослідження зразку у 2-х повторах | – | – |
| | Синтетична РНК EBLV-1 (порогова концентрація) | – | Дослідження зразку у 2-х повторах | – |
| | Синтетична РНК EBLV-2 (порогова концентрація) | – | – | Дослідження зразку у 2-х повторах |

14. Центрифугувати пробірки/плашку при низькій швидкості для осадження внесених зразків на дно пробірок/лунок плашки і змішування їх з реакційною сумішшю.

15. Помістити пробірки/плашку із зразками в ампліфікатор.

16. Запустити програмне забезпечення ампліфікатора і встановити наступні параметри ампліфікації (табл. 14):

Об'єм суміші: 25 мкл

*Таблиця 14*

**Параметри ампліфікації.**

| Етап | | Режим | Кількість циклів |
|---|---|---|---|
| 1. Утримування | Зворотна транскрипція | 50°С – 30 хв | 1 |
| 2. Утримування | Ініціалізація | 95°С – 15 хв | 1 |
| 3. Циклювання | Денатурація | 94°С – 30 с | 45 |
| | Відпал праймерів | 55°С – 30 с | |
| | Елонгація | 72°С – 30 с детекція* (FAM, HEX, Cy5) | |

**Примітки:** * Детекція проводиться на кінці фази елонгації по FAM (виявлення РНК RABV), VIC/HEX (виявлення РНК EBLV-1), Cy5 (виявлення РНК EBLV-2)

***Облік та інтерпретація результатів.***

Облік результатів ампліфікації проводять за допомогою програмного забезпечення ампліфікатора.

*Валідація методу.*

*Валідація зразку на відсутність інгібіторів*. Валідацію зразку на відсутність інгібіторів проводять шляхом дослідження зразку на виявлення мРНК β-актину методом SYBR Green ЗТ-ПЛР-РЧ.

*Валідація ЗТ-ПЛР-РЧ.*

*Таблиця 15*

**Валідація ЗТ-ПЛР-РЧ**

| ПКА | НКА | Результати | Дії |
|---|---|---|---|
| + | - | Результат достовірний | Можлива оцінка результатів дослідження зразків |
| + | + | Результат недостовірний | Необхідно повторити проведення ЗТ-ПЛР-РЧ |
| - | - | | |
| - | + | | |

*Валідація зразків.*

*Таблиця 16*

**Валідація зразків**

| Зразок | НКА | ПКА | Результати |
|---|---|---|---|
| 3 позитивних повторних дослідження / 3 дослідження (Ct<40) | - | + | Виявлено |
| 3 позитивних повторних дослідження/ 3 дослідження (Ct>40) | - | + | Виявлено в межах LD з пізнім значенням Ct |
| 3 негативних повторних дослідження/ 3 дослідження (відсутнє значення Ct) | - | + | Не виявлено |

*Результати.*

*Таблиця 17*

**Результати**

| Зразок | Виявлення мРНК β-актину методом SYBR Green ЗТ-ПЛР-РЧ | Результати |
|---|---|---|
| 3 позитивних повторних дослідження/ 3 дослідження (Ct<40) | + | Виявлено |
| 3 позитивних повторних дослідження/ 3 дослідження (Ct>40) | + | Виявлено в межах LD з пізнім значенням Ct |
| 3 негативних повторних дослідження/ 3 дослідження (відсутнє значення Ct) | + | Не виявлено |
| | - | Не можливо інтерпретувати |

**Виявлення РНК вірусу сказу (класичного вірусу сказу) методом ЗТ-ПЛР-РЧ.**

Даний протокол дає можливість ампліфікувати і виявити ампліфікацію фрагмента N гену класичного вірусу сказу і є комбінацією трьох протоколів: 1-й протокол для виявлення вірусу сказу, розроблений Wakeley та ін., 2-й протокол для виявлення вірусу сказу, розроблений Hoffman та ін., 3-й протокол виявлення гену мРНК β-актину, який слугує ендогенним ВПК, розроблений Toussaint та ін. [19, 29, 30].

***Реагенти*:**

- Вода вільна від нуклеаз;
- Набір SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen, каталожний номер: 11732020);
- Послідовність нуклеотидів праймерів/зондів наведено у таблиці 18.

*Таблиця 18*

**Послідовність нуклеотидів праймерів/зондів**

| Назва набору праймерів та зонду | Функція | Назва праймера/ зонда | Послідовність нуклеотидів (5′-3′) |
|---|---|---|---|
| RV13 | Прямий | JW12 | ATGTAACACCYCTACAATG |
| | Зворотний | N165-146 | GCAGGGTAYTTRTACTCATA |
| | Зонд | LysGT1-FAM | FAM-ACAAGATTGTATTCAAAGTCAATAATCAG-BHQ1 |
| RV14 | Прямий | RV-N F | GATCCTGATGAYGTATGTTCCTA |
| | Зворотний | RV-N R | RGATTCCGTAGCTRGTCCA |
| | Зонд | RabGT1-B-FAM | FAM-CAGCAATGCAGTTYTTTGAGGGGAC-BHQ1 |
| β-actin | Прямий | ACT-1005-F | CAGCACAATGAAGATCAAGATCATC |
| | Зворотний | ACT-1135-R | CGGACTCATCGTACTCCTGCTT |
| | Зонд | ACT-1081-HEX | HEX-TCGCTGTCCACCTTCCAGCAGATGT-BHQ1 |

Готують три робочі суміші праймерів та зонду: 1) RV13 та 2) RV14 з концентрацією 10 мкМ кожного праймера та 1,25 мкМ кожного зонда та 3) суміш β-актину з концентрацією 2,5 мкМ та 1,25 мкМ зонда. Робочі суміші праймерів та зондів також зберігають при температурі мінус $20^0$ С.

**Постановка ЗТ-ПЛР-РЧ.**

1. Підрахувати необхідну кількість реакцій з урахуванням кількості досліджуваних зразків і контролів та підготувати для них пробірки/лунки плашки.

2. Розморозити всі компоненти набору, змішати шляхом вортексування і центрифугувати для осадження крапель реактивів з кришок пробірок.

3. Приготувати реакційну суміш на попередньо підраховану кількість реакцій з врахуванням додаткових 10 % від загального об’єму, необхідних для компенсації втрати реагентів під час приготування реакційної суміші (табл. 19). Реакційну суміш готують в ПЛР боксі призначеному для приготування реакційної суміші.

*Таблиця 19*

**Приготування реакційної суміші.**

| № п/п | Назва реактиву | мкл на реакцію |
|---|---|---|
| 1 | Вода вільна від нуклеаз | 4,75 |
| 2 | 2× RT-PCR Buffer | 12,5 |
| 3 | Суміш RV13 | 1 |
| 4 | Суміш RV14 | 1 |
| 5 | β-актин | 0,25 |
| 6 | RT-PCR Enzyme Mix | 0,5 |
| Загальний об’єм суміші | | **20,0** |

5. Змішати реакційну суміш на вортексі і центрифугувати для осадження крапель реакційної суміші з кришки пробірки.

6. В кожну підготовлену пробірку/лунку плашки внести по 20 мкл реакційної суміші.

7. Внести по 5 мкл РНК дослідних зразків та НКВ у відповідні пробірки/лунки плашки реакційною. Внесення дослідних зразків та контролів у реакційну суміш проводять у ПЛР боксі призначеному для внесення дослідних зразків у реакційну суміш.

11. Внести 5 мкл НКА (вода вільна від нуклеаз) у відповідну пробірку/лунку плашки.

12. Внести 5 мкл ПКА у відповідну пробірку/лунку плашки.

13. Центрифугувати пробірки/плашку при низькій швидкості для осадження внесених зразків на дно пробірок/лунок плашки і змішування їх з реакційною сумішшю.

17. Помістити пробірки/плашку із зразками в ампліфікатор.

18. Запустити програмне забезпечення ампліфікатора і встановити наступні параметри ампліфікації (табл. 20):

Об'єм суміші: 25 мкл

*Таблиця 20*

**Параметри ампліфікації.**

| **Етап** | | **Режим** | **Кількість циклів** |
|---|---|---|---|
| 1. Утримування | Зворотна транскрипція | 50°С − 30 хв | 1 |
| 2. Утримування | Ініціалізація | 95°С − 2 хв | 1 |
| 3. Циклювання | Денатурація | 95°С − 30 с | 45 |
| | Відпал праймерів | 55°С − 1 хв Детекція* (FAM, HEX) | |

* Детекція проводиться на кінці фази елонгації по FAM (виявлення РНК класичного вірусу сказу), VIC/HEX (виявлення ВПК (мРНК β-актину)

***Облік та інтерпретація результатів.***

Облік результатів ампліфікації проводять за допомогою програмного забезпечення ампліфікатора. Інтерпретацію результатів ампліфікації досліджуваних зразків проводять після отримання коректних результатів контролів (ПКА повинен бути позитивним, НКВ та НКА − негативним).

Зразок вважають позитивним на сказ (виявлено РНК вірусу сказу), якщо в ньому спостерігається накопичення інтенсивності флуоресценції по каналу FAM, крива накопичення має характерну сигмоїдальну форму, значення Ct < 40.

Зразок вважають слабопозитивним на сказ (виявлено низька концентрація РНК вірусу сказу), якщо в ньому спостерігається накопичення інтенсивності флуоресценції по каналу FAM, крива накопичення має характерну сигмоїдальну форму, значення Ct знаходиться в межах >35− <40, при цьому мРНК β-актину виявляється в достатньо високій концентрації (низькі значення Ct по каналу HEX).

Зразок вважать негативним на сказ (не виявлено РНК вірусу сказ), якщо в ньому не спостерігається накопичення інтенсивності флуоресценції по каналу

FAM, при цьому мРНК β-актину виявляється в достатньо високій концентрації (низькі значення Ct по каналу HEX).

**Виявлення РНК вірусів роду *Lyssavirus* методом напівгніздової ЗТ-ПЛР.**

Даний протокол базується на звичайній напівгніздовій ЗТ-ПЛР. Використання напівгніздової ЗТ-ПЛР дає можливість підвищити чутливість реакції.

Протокол дає можливість ампліфікувати фрагмент N ген (606 пн) усіх визнаних ICTV видів ліссавірусів із використанням праймерів, які використовуються для виявлення вірусів роду *Lyssavirus* JW12 (прямий) та JW6 (зворотний), протокол розроблений Heaton та ін. Зворотній праймер JW10, який приєднується в середині фрагменту, ампліфікованого під час першого раунду ЗТ-ПЛР в комбінації з JW12 під час другого раунду напівгніздової ЗТ-ПЛР ампліфікують фрагмент довжиною 589 пн. [24].

Паралельно проводять тестування кожного зразка на виявлення мРНК β-актину, для того щоб бути впевненим у виділені достатньої кількості РНК та відсутності інгібіторів у дослідному зразку.

***Реагенти*:**

- Вода вільна від нуклеаз;
- Набір One step RT-PCR kit (Qiagen, каталожний номер: 210212);
- Platinium Taq polymerase;
- Електрофорез: забарвлений завантажуючий буфер, агароза, ДНК маркер, ТАЕ буфер;
- Послідовність нуклеотидів праймерів наведено у таблиці 21.

*Таблиця 21*

**Послідовність нуклеотидів праймерів**

| Праймер | Функція | Послідовність нуклеотидів (5′-3′) | Використання | Ціль |
|---|---|---|---|---|
| JW12 | Прямий | ATGTAACACCYCTACAATG | ЗТ-ПЛР, гніздова ПЛР | Lyssavirus |
| JW6.1 | Зворотній | CAATTCGCACACATTTTGTG | ЗТ-ПЛР | Lyssavirus |
| JW6.2 | | CAGTTGGCACACATCTTGTG | | |
| JW6.3 | | CAGTTAGCGCACATCTTATG | | |
| JW10.1 | Зворотній | GTCATCAAAGTGTGRTGCTC | гніздова ПЛР | Lyssavirus |
| JW10.2 | | GTCATCAATGTGTGRTGTTC | | |
| JW10.3 | | GTCATTAGAGTATGGTGTTC | | |
| β-actine_int | Прямий | CGATGAAGATCAARTCATTGC | ЗТ-ПЛР | β-актин |
| β-actine_rev | Зворотній | AAAGCATTTGCGGTGGAC | | |

**ЗТ-ПЛР.**

1. Підрахувати необхідну кількість реакцій з урахуванням кількості досліджуваних зразків і контролів та підготувати для них пробірки/лунки плашки.

2. Розморозити всі компоненти набору, змішати шляхом вортексування і центрифугувати для осадження крапель реактивів з кришок пробірок.

3. Приготувати реакційну суміш для виявлення РНК вірусів роду *Lyssavirus* на попередньо підраховану кількість реакцій з врахуванням додаткових 10 % від загального об’єму, необхідних для компенсації втрати реагентів під час

приготування реакційної суміші (табл. 22). Реакційну суміш готують в ПЛР боксі призначеному для приготування реакційної суміші.

*Таблиця 22*

**Приготування реакційної суміші для виявлення РНК вірусів роду *Lyssavirus***

| № п/п | Назва реактиву | Початкова концентрація | Фінальна концентрація | мкл на реакцію |
|---|---|---|---|---|
| 1 | Вода вільна від нуклеаз | - | - | 4,25 |
| 2 | Qiagen One step RT-PCR | 5× | 1× | 3 |
| 3 | dNTPs (10mM) | 10 мкМ | 0,4 мкМ | 0,6 |
| 4 | Прямий праймер JW12 | 20 мкМ | 0,7 мкМ | 0,525 |
| 5 | Зворотний праймер JW6.1 | 20 мкМ | 0,7 мкМ | 0,525 |
| 6 | Зворотний праймер JW6.2 | 20 мкМ | 0,7 мкМ | 0,525 |
| 7 | Зворотний праймер JW6.3 | 20 мкМ | 0,7 мкМ | 0,525 |
| 8 | Qiagen RT-PCR Enz mix | - | - | 0,6 |
| 9 | RNAse Inibitor | 40 U/µl | 20 U/µl | 0,5 |
| Загальний об’єм суміші | | | | **11,5** |

5. Змішати реакційну суміш на вортексі і центрифугувати для осадження крапель реакційної суміші з кришки пробірки.

6. В кожну підготовлену пробірку/лунку плашки внести по 10 мкл реакційної суміші.

7. Приготувати реакційну суміш для виявлення мРНК β-актину на попередньо підраховану кількість реакцій з врахуванням додаткових 10 % від загального об’єму, необхідних для компенсації втрати реагентів під час приготування реакційної суміші (табл. 23). Реакційну суміш готують в ПЛР боксі призначеному для приготування реакційної суміші.

*Таблиця 23*

**Приготування реакційної суміші для виявлення мРНК β-актину**

| № п/п | Назва реактиву | Початкова концентрація | Фінальна концентрація | мкл на реакцію |
|---|---|---|---|---|
| 1 | Вода вільна від нуклеаз | - | - | 4,25 |
| 2 | Qiagen One step RT-PCR | 5× | 1× | 3 |
| 3 | dNTPs (10mM) | 10 мкМ | 0,4 мкМ | 0,6 |
| 4 | Прямий праймер Beta actin_int | 20 мкМ | 0,8 мкМ | 0,6 |
| 5 | Зворотний праймер Beta actin_rev | 20 мкМ | 0,8 мкМ | 0,6 |
| 6 | Qiagen RT-PCR Enz mix | - | - | 0,6 |
| 7 | RNAse Inibitor | 40 U/µl | 20 U/µl | 0,5 |
| Загальний об’єм суміші | | | | **10,15** |

Змішати реакційну суміш на вортексі і центрифугувати для осадження крапель реакційної суміші з кришки пробірки.

9. В кожну підготовлену пробірку/лунку плашки внести по 10 мкл реакційної суміші.

10. Внести по 5 мкл РНК дослідних зразків та НКВ у відповідні пробірки/лунки плашки реакційною сумішшю для виявлення РНК вірусів роду *Lyssavirus.* Внесення дослідних зразків та контролів у реакційну суміш проводять у ПЛР боксі призначеному для внесення дослідних зразків у реакційну суміш.

11. Внести 5 мкл НКА (вода вільна від нуклеаз) у відповідну пробірку/лунку плашки з реакційною сумішшю для виявлення РНК вірусів роду *Lyssavirus*.

12. Внести 5 мкл ПКА у відповідну пробірку/лунку плашки з реакційною сумішшю для виявлення РНК вірусів роду *Lyssavirus*.

13. Внести по 5 мкл РНК дослідних зразків та НКВ у відповідні пробірки/лунки плашки реакційною сумішшю для виявлення мРНК β-актину. Внесення дослідних зразків та контролів у реакційну суміш проводять у ПЛР боксі призначеному для внесення дослідних зразків у реакційну суміш.

14. Внести 5 мкл НКА (вода вільна від нуклеаз) у відповідну пробірку/лунку плашки з реакційною сумішшю для виявлення мРНК β-актину.

15. Внести 5 мкл ПКА у відповідну пробірку/лунку плашки з реакційною сумішшю для виявлення мРНК β-актину.

16. Центрифугувати пробірки/плашку при низькій швидкості для осадження внесених зразків на дно пробірок/лунок плашки і змішування їх з реакційною сумішшю.

17. Помістити пробірки/плашку із зразками в ампліфікатор.

18. Запустити програмне забезпечення ампліфікатора і встановити наступні параметри ампліфікації (табл. 24-25):

Об’єм суміші: 15 мкл

*Таблиця 24*

**Параметри ампліфікації РНК вірусів роду *Lyssavirus***

| Етап | | Режим | Кількість циклів |
|---|---|---|---|
| 1. Утримування | Зворотна транскрипція | 50°С – 30 хв | 1 |
| 2. Утримування | Ініціалізація | 95°С – 15 хв | 1 |
| 3. Циклювання | Денатурація | 94°С – 30 с | 45 |
| | Відпал | 55°С – 30 с | |
| | Елонгація | 72°С – 1 хв | |
| 4. | Кінцева елонгація | 72°С – 10 хв | 1 |

*Таблиця 25*

**Параметри ампліфікації мРНК β-актину**

| Етап | | Режим | Кількість циклів |
|---|---|---|---|
| 1. Утримування | Зворотна транскрипція | 50°С – 30 хв | 1 |
| 2. Утримування | Ініціалізація | 95°С – 15 хв | 1 |
| 3. Циклювання | Денатурація | 94°С – 30 с | 45 |
| | Відпал | 50°С – 30 с | |
| | Елонгація | 72°С – 1 хв | |
| 4. | Кінцева елонгація | 72°С – 10 хв | 1 |

Продукт ампліфікації із ЗТ-ПЛР по виявленню РНК вірусів роду *Lissavirus* використовують для проведення гніздової ПЛР. Його можна зберігати при

температурі 5 ± 3°С протягом дня, для більш довготривалого зберігання необхідно зберігати при температурі не вище мінус 16°С.

Продукт ампліфікації із ЗТ-ПЛР по виявленню мРНК β-актину зберігають при температурі 5 ± 3°С до проведення електрофорезу.

**Гніздова ПЛР.**

19. Підрахувати необхідну кількість реакцій з урахуванням кількості досліджуваних зразків і контролів та підготувати для них пробірки/лунки плашки.

20. Розморозити всі компоненти набору, змішати шляхом вортексування і центрифугувати для осадження крапель реактивів з кришок пробірок.

21. Приготувати реакційну суміш для гніздової ПЛР на попередньо підраховану кількість реакцій з врахуванням додаткових 10 % від загального об'єму, необхідних для компенсації втрати реагентів під час приготування реакційної суміші (табл. 26). Реакційну суміш готують в ПЛР боксі призначеному для приготування реакційної суміші.

*Таблиця 26*

**Приготування реакційної суміші**

| № п/п | Назва реактиву | Початкова концентрація | Фінальна концентрація | мкл на реакцію |
|---|---|---|---|---|
| 1 | Вода вільна від нуклеаз | - | - | 14,45 |
| 2 | PCR buffer без $MgCl_2$ | 10× | 1× | 2 |
| 3 | $MgCl_2$ | 50 мМ | 1,5 мМ | 0,6 |
| 4 | dNTPs | 10 мкМ | 0,4 мкМ | 0,6 |
| 5 | Прямий праймер JW12 | 20 мкМ | 0,25 мкМ | 0,25 |
| 6 | Зворотний праймер JW10.1 | 20 мкМ | 0,25 мкМ | 0,25 |
| 7 | Зворотний праймер JW10.2 | 20 мкМ | 0,25 мкМ | 0,25 |
| 8 | Зворотний праймер JW10.3 | 20 мкМ | 0,25 мкМ | 0,25 |
| 9 | Taq Platinum | 5 U/µl | 1,25 U/µl | 0,25 |
| Загальний об'єм суміші | | | | **18,9** |

22. Змішати реакційну суміш на вортексі і центрифугувати для осадження крапель реакційної суміші з кришки пробірки.

23. В кожну підготовлену пробірку/лунку плашки внести по 18 мкл реакційної суміші.

24. Додати 2 мкл продукт ампліфікації із ЗТ-ПЛР по виявленню РНК вірусів роду *Lissavirus* у відповідні пробірки. Внесення продуктів ампліфікації проводять в робочій зоні 5 в ПЛР боксі.

25. Центрифугувати пробірки/плашку при низькій швидкості для осадження внесених зразків на дно пробірок/лунок плашки і змішування їх з реакційною сумішшю.

26. Помістити пробірки/плашку із зразками в ампліфікатор.

27. Запустити програмне забезпечення ампліфікатора і встановити наступні параметри ампліфікації (табл. 27):

Об'єм суміші: 20 мкл

*Таблиця 27*

**Параметри ампліфікації.**

| Етап | | Режим | Кількість циклів |
|---|---|---|---|
| 1. Утримування | Активація полімерази | 94°C − 2 хв | 1 |
| 2. Циклювання | Денатурація | 94°C − 30 с | 30 |
| | Відпал | 55°C − 30 с | |
| | Елонгація | 72°C − 1 хв | |
| 3. Утримування | Кінцева елонгація | 72°C − 10 хв | 1 |

*Проведення електрофорезу.*

До 5 мкл кожного продукту ампліфікації «Lissavirus» (досліджуваний і контрольні зразки реакції після проведення першого раунду напівгніздової ПЛР) додають 1 мкл завантажуючого буфера. Теж саме роблять і для продуктів ампліфікації «β-актин». Суміші поміщають в лунки пластини 1,5 % агарозного гелю, до якого під час приготування будо додано інтеркалюючий барвник (наприклад, SYBR safe, 1 мкл на 10 мл агарозного гелю).

Також в лунки агарозного гелю додають ДНК-маркер, для оцінки довжини фрагментів продуктів ампліфікації.

*Аналіз ПЛР продуктів.*

Результат вважають позитивним, коли виявлено фрагмент кДНК очікуваної довжини:

- 606 пн для першого раунду ЗТ-ПЛР по виявленню РНК вірусів роду *Lissavirus;*
- 589 пн для гніздової ПЛР по виявленню РНК вірусів роду *Lissavirus;*
- 153 пн для ЗТ-ПЛР по виявленню мРНК β-актину.

Результат негативний:

- коли не виявлено кДНК фрагментів після напівгніздової ЗТ-ПЛР по виявленню РНК вірусів роду *Lissavirus;*
- коли не виявлено кДНК фрагментів після ЗТ-ПЛР по виявленню мРНК β-актину.

*Валідація реакції.*

Виявлення мРНК β-актину: НКВ та НКА повинні бути негативними, ПКА – позитивним.

Виявлення РНК вірусів роду *Lissavirus:* НКВ та НКА повинні бути негативними, ПКА – позитивним.

*Валідація зразків.*

**ВПК (β-актин):**

- Зразок вважають позитивним, якщо результат ЗТ-ПЛР по виявленню β-актину позитивний (виявлено фрагмент ДНК довжиною ≈ 153 пн). Позитивний та негативні контролі повинні відповідати валідаційним критеріям.
- Зразок вважають негативним, якщо результат ЗТ-ПЛР по виявленню β-актину негативний (не виявлено фрагмент ДНК довжиною ≈ 153 пн). Позитивний та негативні контролі повинні відповідати валідаційним критеріям.

Коли зразок негативний на β-актин, його необхідно провірити на відсутність інгібіторів шляхом повторного дослідження зразка в розведенні 1:10.

**РНК вірусів роду *Lissavirus*.**

- Зразок вважають позитивним, якщо результат ЗТ-ПЛР по виявленню РНК вірусів роду *Lissavirus* (виявлено фрагмента кДНК з довжиною ≈ 606 пн) або гніздова ПЛР (виявлено фрагмент кДНК довжиною ≈ 589 пн) є позитивними. Позитивний та негативні контролі повинні відповідати валідаційним критеріям.

- Зразок вважається негативним, якщо результат ЗТ-ПЛР по виявленню РНК вірусів роду *Lissavirus* негативний (відсутній фрагмент кДНК довжиною ≈ 589 пн.). Позитивний та негативні контролі повинні відповідати валідаційним критеріям.

*Результати досліджень.*

Результати дослідження вважають позитивними (зразок містить РНК вірусів роду *Lissavirus*), якщо зразок вважають позитивним по виявленню РНК вірусів роду *Lissavirus* та мРНК β-актину.

Результати дослідження вважають негативними (зразок не містить РНК вірусів роду *Lissavirus*), якщо зразок вважають негативним по виявленню РНК вірусів роду *Lissavirus* але позитивним по виявленню мРНК β-актину.

Результати дослідження вважають такими, що не піддаються інтерпретації, якщо зразок вважають негативним по виявленню РНК вірусів роду *Lissavirus* та негативним по виявленню мРНК β-актину.

## 3. Схема діагностики сказу (перспективи впровадження, недоліки різних методів)

Еталонним із існуючих в наш час методів експрес-діагностики сказу є МФА. Щорічно цим методом мережею діагностичних лабораторій проводиться від 10 до 20 тисяч досліджень патологічного матеріалу. 94,5 % встановлених остаточних результатів в Україні здійснюється постановкою тесту МФА, що свідчить про високу діагностичну цінність цього методу.

В Україні МФА впроваджена у рутинну лабораторну практику усіма державними регіональними лабораторіями ветеринарної медицини, які акредитовані, уповноважені та проходять щорічне підтвердження компетенції відповідно програми ВЕТ-ТЕСТ, що організовує ДНДІЛДВСЕ [10]. Слід враховувати те, що чутливість цього методу залежить від ступеня аутолізу зразку, досвіду дослідника, якість антирабічного кон'югату і основного обладнання (флуоресцентного мікроскопа). У випадках сумнівних результатів МФА, або у випадках контакту з людиною рекомендуються подальші дослідження. Це особливо важливо, коли патологічний матеріал із значними ознаками автолізу.

Біологічна проба на мишах – один з найбільш чутливих і достовірних методів лабораторної діагностики сказу. В Україні, при негативних, або сумнівних результатах в МФА, цими дослідженнями додатково виявляється захворювання ще у близько 5 % випадків [25]. Тобто метод застосовується в усіх регіональних лабораторіях ветеринарної медицини України як дублюючий тест.

Не дивлячись на те, що біологічна проба є високочутливим методом діагностики сказу, він має суттєві недоліки, а саме: необхідною умовою є дослідження свіжого матеріалу, потрібна значна кількість мишей (не менше 6 голів), тривалий період проведення тесту (інкубаційний період заражених мишей вуличним типом віруса сказу може становити від 7 до 28 діб, тому

тривалість спостереження за мишами становить до 30 діб), що обумовлює пізню відповідь щодо наявність або відсутність клінічного прояву захворювання. Недоліками біопроби як методу виділення вірусу сказу є потенційна можливість виносу збудника за межі лабораторії. Крім того, проведення біопроби економічно не обґрунтоване, адже вимагає спеціалізованого окремого приміщення на рівні BSL-3 та обслуговуючого персоналу, який повинен бути щеплений проти сказу.

Біологічна проба на тваринах – найдавніший метод, який протягом свого тривалого використання у всьому світі безапеляційно довів свою цінність для виявлення вірусу сказу. Але незручності під час проведення цієї реакції вимагають заміни рівноцінними за чутливістю та специфічністю методами – такими як виявлення вірусу сказу в клітинних культурах.

Аналогічно як і БП, ізоляція вірусу в культурі клітин використовується як підтверджуючий тести, якщо тест МФА на виявлення антигену вірусу сказу, або ПЛР на виявлення геному дають сумнівні результати [15, 16, 20, 27].

Перспективи впровадження ІВКК досить значні в країнах, що розвиваються (в т.ч. і в Україні), так як з часом виділення вірусу в культурі клітин повинно замінити біологічну пробу на мишах. Вважається, що вірусовиділення в культурі клітин володіє аналогічною чутливістю, що й БП [7, 27]. Однак, тест дає досить швидко остаточні результати – протягом трьох діб (БП – 30 діб). А при дотриманні усіх необхідних умов біологічної безпеки (рівень BSL-3) є менш дорогим порівняно з БП. До цього ж, виділення вірусів із патологічного матеріалу під час рутинної діагностики сказу та подальших досліджень, метод ІВКК володіє суттєвими перевагами порівняно з БП (рис. 9).

Звичайно основною проблемою виділення вірусу в культурі клітин є цитотоксичність патологічного матеріалу. Запропоновані різні варіації постановки реакції для зменшення цитотоксичності, що включають додавання антибіотиків, скорочення часу інкубації перед зміною середовища (до 35 хвилин) та розведення дослідних зразків. Однак, основною вимогою перед впровадженням ІВКК, або її варіацій, є валідація з іншими методиками та визначення чутливості, специфічності та достовірності.

Отримати позитивний результат використовуючи метод ІВКК максимально швидко можна протягом 96 год. Однак для підтвердження негативного результату необхідно проводити три послідовні пасажі, що займає не менше 12 діб.

Для ідентифікації вірусу сказу все ширше застосовуються методи детекції геному, в першу чергу це ЗТ-ПЛР [26]. Розроблені протоколи ЗТ-ПЛР досягли чутливості та специфічності такого ж рівня як і у МФА (98-100 %). Це дає можливість використовувати метод ЗТ-ПЛР як альтернативу МФА. Даний метод виявлення РНК вірусу сказу та інших вірусів роду *Lissavirus* особливо часто використовується у випадках, коли необхідно дослідити велику кількість зразків. Для діагностики сказу використовую звичайну ЗТ-ПЛР та ЗТ-ПЛР-РЧ, виявляють фрагмент РНК специфічний для усіх вірусів роду *Lissavirus* або фрагмент РНК специфічний для класичного вірусу сказу. Звичайну ЗТ-ПЛР використовують у варіанті напівгніздової для підвищення чутливості реакції.

Оскільки при дослідженні зразків звичайною ЗТ-ПЛР існує високий ризик перехресної контамінації і вона є тривалішою по часу, тому частіше використовують ЗТ-ПЛР-РЧ. На відміну від звичайної ЗТ-ПЛР, ЗТ-ПЛР-РЧ

поєднує в собі ампліфікацію і детекцію ампліфікації в закритій пробірці; таким чином, метод ЗТ-ПЛР-РЧ дає більш швидку і надійну індикацію присутності РНК вірусів роду *Lissavirus* підозрілих зразках.

Для виявлення ампліконів у ЗТ-ПЛР-РЧ використовують два підходи, вибір яких залежить від мети проведення дослідження (діагностичні чи моніторингові дослідження). Один підхід полягає в додаванні до реакційної суміші ДНК-інтеркалюючого барвника (флуорохрома). Інтеркалюючі флуорохроми (такі як SYBR Green або ResoLight) зв'язуються з дволанцюговою ДНК під час ПЛР. Зв’язані флуорохроми випромінюють флуоресценцію, яка реєструється ампліфікатором під час кожного циклу ампліфікації. Оскільки такі барвники можуть також зв'язуватися з неспецифічними ПЛР-продуктами, в кінці ампліфікації необхідно провести аналіз кривої плавлення, щоб підтвердити ампліфікацію специфічного фрагменту. Це необхідно враховувати при виборі варіанту ПЛР, оскільки не всі моделі ампліфікаторів можуть провести такий аналіз.

Другий підхід передбачає використання гідролізних зондів (наприклад, TaqMan зондів). Ці зонди використовують флуоресцентно-резонансну передачу енергії (FRET), при якій молекула гасника на 3'-кінці спеціально сконструйованого олігонуклеотиду гасить флуоресценцію, випромінювану ковалентно приєднаним до 5'-кінця флуорофором. Поки флуорофор і гасник знаходяться на близькій відстані, гасник пригнічує будь-які сигнали флуоресценції флуорофора, які в іншому випадку реєструвалися б ампліфікатором. Коли зонд зв'язується з ділянкою-мішенню під час ампліфікації, екзонуклеазна активність полімерази призводить до розщеплення зонду, внаслідок чого флуорофор і гасник будуть находитися на великій відстані один від одного, в результаті чого світіння флуорофора не буде поглинатися гасником, і світіння флуорофора буде реєструватися приладом. Хоч підхід ЗТ-ПЛР-РЧ із використанням зондів за своєю суттю є більш специфічним, ніж з інтеркалюючими барвниками, однак розробка зонду, який здатний б був виявляти всі ліссавіруси при невеликій довжині амплікону, є складною задачою.

У порівнянні зі звичайною ЗТ-ПЛР, обидва підходи до виявлення ампліконів у ЗТ-ПЛР-РЧ не потребують відкриття пробірок і проведення подальших досліджень по виявленню продуктів ампліфікації, що зменшує ймовірність перехресної контамінації та отримання хибно позитивних результатів.

Для виявлення ліссавірусів розроблено багато варіантів протоколів ЗТ-ПЛР-РЧ, деякі з них селективно розроблені для окремого штаму вірусу або лінії вірусу, в той час як інші були розроблені для виявлення більш широкого спектру штамів вірусу сказу та/або видів ліссавірусів. Всі опубліковані протоколи досліджень мають обмеження щодо їх діагностичного діапазону через обмежену доступність польових зразків, які використовувалися для валідації протоколів. Тому дуже важливо враховувати лінії та штами ліссавірусів у кожному регіоні при застосуванні протоколу дослідження методу ПЛР. Протоколи ЗТ-ПЛР-РЧ на основі зондів, при досліджені зразків, які можуть містити нові штами вірусів, можуть виявитися не ефективними.

Таким чином вибір між SYBRGreen ЗТ-ПЛР-РЧ та TaqMan ЗТ-ПЛР-РЧ буде залежати від мети застосування. Для проведення скринінгових досліджень, де

ймовірно буде велика кількість негативних зразків, використання дешевшої SYBRGreen ЗТ-ПЛР-РЧ є оптимальним. Застосування SYBRGreen ЗТ-ПЛР-РЧ також буде оптимальним при проведенні скринінгових досліджень, коли можуть бути присутніми нові або дивергентні штами ліссавірусів, які в іншому випадку не були б виявлені за допомогою TaqMan ЗТ-ПЛР-РЧ. Натомість використання більш специфічної та чутливої TaqMan ЗТ-ПЛР-РЧ буде доцільним у випадках дослідження підозрілих зразків, які, як очікується, можуть містити обмежений видовий спектр ліссавірусів і низьке вірусне навантаження.

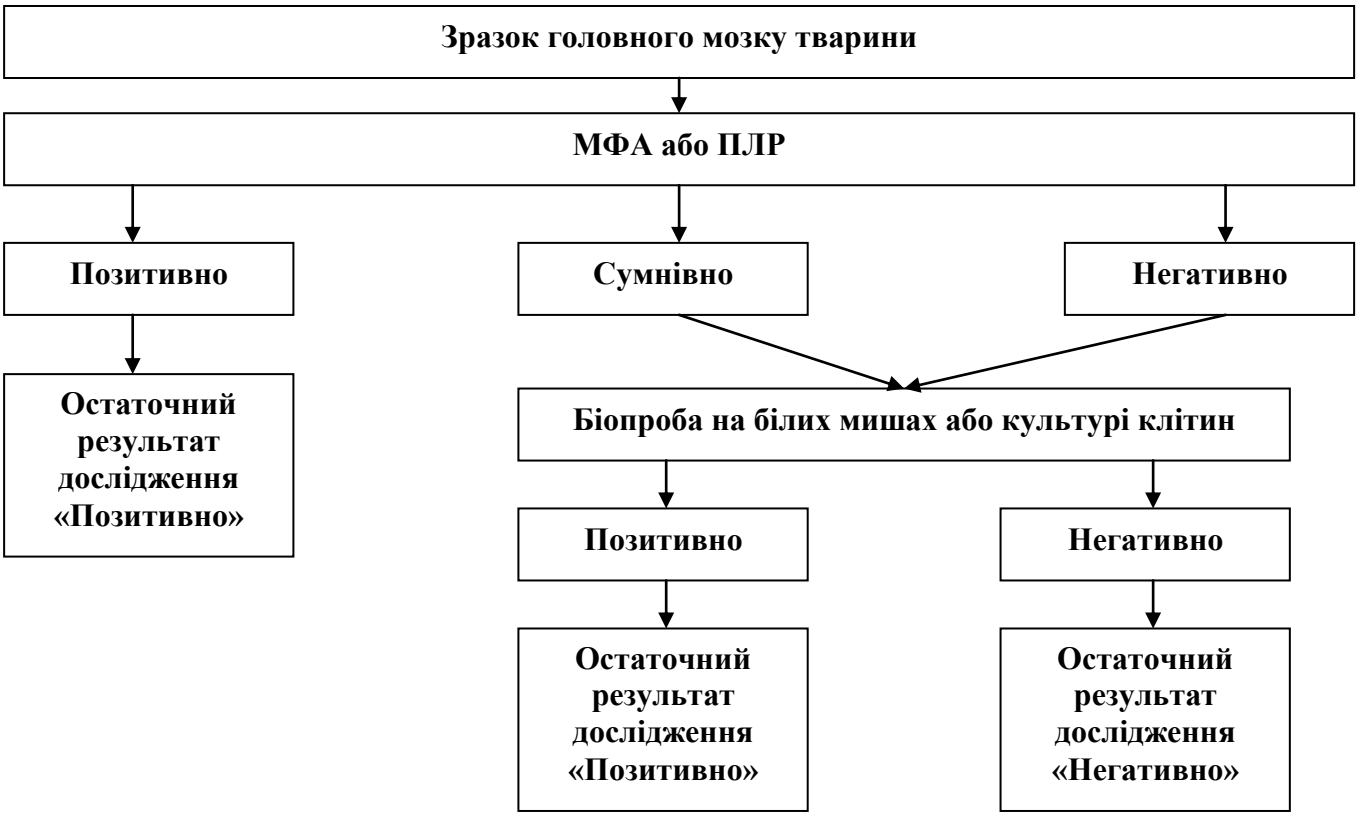


**Рис. 9. Схема лабораторної діагностики сказу тварин**

Зразок вважають позитивним (містить вірус сказу) у разі отримання позитивних результатів одним із методів: МФА, ЗТ-ПЛР, виявлення вірусу у біопробі на білих мишах або культурі клітин.

Спочатку зразки досліджують первинними методами діагностики сказу: МФА або ЗТ-ПЛР, у випадку отримання сумнівних або негативних результатів додатково проводять дослідження зразків по виявленню вірусу біопробою на білих мишах або культурі клітин.

## Список використаної літератури.


1. Голік М.О. Характеристика епізоотичної ситуації зі сказу в Україні / М .О. Голік, В. В. Недосеков, К. П. Карловська, І. М. Полупан// Тваринництво України. – 2015. – № 9. – С. 16-19.
2. ДСП 9.9.5.-080-02 «Державні санітарні правила та норми, гігієнічні нормативи. Правила влаштування і безпеки роботи в лабораторіях (відділах, відділеннях) мікробіологічного профілю», затверджених постановою Головного державного санітарного лікаря України від 28.01.2002 №1.
3. ДСТУ 7053:2009 Методи діагностики сказу. Ветеринарна медицина. Національний стандарт України.
4. Інструкція про заходи щодо боротьби зі сказом тварин. Затверджена Головним управлінням ветеринарної медицини з Держветінспекцією Мінсільгоспроду України, наказ від 15.03.1994 № 5 (z0053-94). Режим доступу: https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0054-94#Text.
5. Методичні рекомендації «Планування, організація та проведення пероральної імунізації м'ясоїдних тварин проти сказу», розглянуті та схвалені Науково-методичною рабою Держаної служби України з питань безпечності харчових продукті та захисту споживачів (Протокол №1 від 24.04.2018 р., із змінами та доповненнями, внесеними згідно із Протоколом №3 від 20.12.2018 р.).
6. Недосєков В.В., Гришок Л.П., Полупан І.М., Іванов М.Ю., Щербань Ю.П. (2010). Деклараційний патент України на корисну модель № 47938. Спосіб отримання мозкової суспензії вірусу сказу, бюл. № 4.
7. Полупан І. М., Недосєков В.В., Рудой О.В. (2021). Лабораторна діагностика сказу. Київ: ДНДІЛДВСЕ.
8. Полупан І.М., Рудой, О.В. (2024). Виділення вірусу сказу в культурі клітин. Бюлетень «Ветеринарна біотехнологія», 44. 103–108. doi:10.31073/vet_biotech44-09.
9. Про затвердження Правил облаштування і утримання діючих (існуючих) худобомогильників та біотермічних ям для захоронення трупів тварин у населених пунктах України. Затверджено Державним комітетом ветеринарної медицини України від 27.10.2008 р. № 232 / зареєстровано Мінюсті України від 29.01.2009 р. № 85/ 16101.
10. Олійник Н.М., Покришко О.В. (2018). Лабораторна діагностики сказу – реалії та перспективи (оглядова стаття). Ветеринарна біотехнологія 32 (2), 397-404.
11. Регламент Комісії (ЄС) № 576/2013 режим доступу: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?qid=1421225918429&uri=CELEX:32013R0576
12. Регламент Комісії (ЄС) № 577/2013 режим доступу: https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:178:0109:0148:EN:PDF
13. Рудой, О.В., Дрожже, Ж.М., Кардаш, О.В., Дедок, Л.А., Полупан, І.М. (2022). Розробка стандартизованих методичних підходів до організації та проведення міжлабораторних порівняльних випробувань зі сказу в Україні. Ветеринарна біотехнологія, 40. 110–120. https://doi.org/10.31073/vet_biotech39-10.
14. Drzewnioková P, Marciano S, Leopardi S, Panzarin V, De Benedictis P. Comparison of Pan-Lyssavirus RT-PCRs and Development of an Improved Protocol for

Surveillance of Non-RABV Lyssaviruses. Viruses. 2023; 15(3):680. https://doi.org/10.3390/v15030680
15. Fischer, S., Freuling, C. M., Müller, T., Pfaff, F., Bodenhofer, U., Höper, D., Fischer, M., Marston, D. A., Fooks, A. R., Mettenleiter, T. C., Conraths, F. J., & Homeier-Bachmann, T. (2018). Defining objective clusters for rabies virus sequences using affinity propagation clustering. PLoS neglected tropical diseases, 12(1), e0006182. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006182.
16. Gao, J., Wang, X., Zhao, M., Liu, E., Duan, M., Guan, Z., Guo, Y., & Zhang, M. (2019). Entry of Challenge Virus Standard (CVS) -11 into N2a cells via a clathrin-mediated, cholesterol-, dynamin-, pH-dependent endocytic pathway. Virology journal, 16(1), 80. https://doi.org/10.1186/s12985-019-1186-9.
17. Gigante, C. M., Dettinger, L., Powell, J. W., Seiders, M., Condori, R., Griesser, R., Okogi, K., Carlos, M., Pesko, K., Breckenridge, M., Simon, E., Chu, M., Davis, A. D., Brunt, S. J., Orciari, L., Yager, P., Carson, W. C., Hartloge, C., Saliki, J. T., Sanchez, S., Li, Y. (2018). Multi-site evaluation of the LN34 pan-lyssavirus real-time RT-PCR assay for post-mortem rabies diagnostics. PloS one, 13(5), e0197074. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197074.
18. Hayman DT, Banyard AC, Wakeley PR, Harkess G, Marston D, Wood JL, et al. A universal realtime assay for the detection of Lyssaviruses. J Virol Methods 2011; 177:87-93.
19. Hoffmann B, Freuling CM, Wakeley PR, Rasmussen TB, Leech S, Fooks AR, Beer M, Müller T. Improved safety for molecular diagnosis of classical rabies viruses by use of a TaqMan real-time reverse transcription-PCR "double check" strategy. J Clin Microbiol. 2010 Nov;48(11):3970-8. doi: 10.1128/JCM.00612-10. Epub 2010 Aug 25. PMID: 20739489; PMCID: PMC3020878.
20. Kulonen, K., Fekadu, M., Whitfield, S., & Warner, C. K. (1999). An evaluation of immunofluorescence and PCR methods for detection of rabies in archival Carnoy-fixed, paraffin-embedded brain tissue. Zentralblatt fur Veterinarmedizin. Reihe B. Journal of veterinary medicine. Series B, 46(3), 151–155. https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.1999.00200.x.
21. Laboratory techniques in rabies, fifth edition. Volume 1 / Charles E Rupprecht, Anthony R Fooks, Bernadette Abela-Ridder, editors.
22. Laboratory techniques in rabies, fifth edition. Volume 2 / Charles E Rupprecht, Anthony R Fooks, Bernadette Abela-Ridder, editors.
23. Madhusudana, S.N., Sundaramoorthy, S., & Ullas, P.T. (2010). Utility of human embryonic kidney cell line HEK-293 for rapid isolation of fixed and street rabies viruses: comparison with Neuro-2a and BHK-21 cell lines. International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases, 14(12), e1067-e1071. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2010.07.004.
24. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 3.1.18. Rabies (infection with rabies virus and other lyssaviruses). (2024). https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.18_RABIES.pdf
25. Mazur, N., Nedosekov, V., & Polupan, I. (2015). The role of the fat in laboratory diagnosis of rabies. Ветеринарна біотехнологія, (26), 232-236.

26. Picard-Meyer, E., Robardet, E., Moroz, D., Trotsenko, Z., Drozhzhe, Z., Biarnais, M., Solodchuk, V., Smreczak, M., & Cliquet, F. (2012). Molecular epidemiology of rabies in Ukraine. Archives of virology, 157(9), 1689–1698. https://doi.org/10.1007/s00705-012-1351-6.
27. Robardet, E., Picard-Meyer, E., Andrieu, S., Servat, A., & Cliquet, F. (2011). International interlaboratory trials on rabies diagnosis: an overview of results and variation in reference diagnosis techniques (fluorescent antibody test, rabies tissue culture infection test, mouse inoculation test) and molecular biology techniques. Journal of virological methods, 177(1), 15–25. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.06.004.
28. Rupprecht C. E., Xiang Z., Servat A., Franka R., Kirby J., & Ertl H. (2018). Erratum: Rupprecht C.E., et al. Additional Progress in the Development and Application of a Direct, Rapid Immunohistochemical Test for Rabies Diagnosis. Vet. Sci. 2018, 5, 59. Veterinary sciences, 5(3), 68. https://doi.org/10.3390/vetsci5030068.
29. Toussaint JF, Sailleau C, Breard E, Zientara S, De Clercq K. Bluetongue virus detection by two real-time RT-qPCRs targeting two different genomic segments. J Virol Methods. 2007 Mar;140(1-2):115-23. doi: 10.1016/j.jviromet.2006.11.007. Epub 2006 Dec 28. PMID: 17196266.
30. Wakeley PR, Johnson N, McElhinney LM, Marston D, Sawyer J, Fooks AR. Development of a realtime, TaqMan reverse transcription-PCR assay for detection and differentiation of lyssavirus
genotypes 1, 5, and 6. J Clin Microbiol. 2005 Jun;43(6):2786-92.
31. Walker P.J., Blasdell K.R., Calisher C.H., Dietzgen R.G., Kondo H., Kurath G., Longdon B., Stone D.M., Tesh R.B., Tordo N., Vasilakis N., Whitfield A.E., and ICTV Report Consortium. 2018, ICTV Virus Taxonomy Profile: Rhabdoviridae, Journal of General Virology, 99:447–448.
32. Wang X., Zhang S., Sun C., Yuan Z. G., Wu X., Wang D., Ding Z., & Hu R. (2011). Proteomic profiles of mouse neuro N2a cells infected with variant virulence of rabies viruses. Journal of microbiology and biotechnology, 21(4), 366–373.
33. Warner C., Fekadu M., Whitfield S., & Shaddock J. (1999). Use of anti-glycoprotein monoclonal antibodies to characterize rabies virus in formalin-fixed tissues. Journal of virological methods, 77(1), 69–74. https://doi.org/10.1016/s0166-0934(98)00136-0.
34. Whitfield S. G., Fekadu M., Shaddock J. H., Niezgoda M., Warner C. K., Messenger S. L., & Rabies Working Group (2001). A comparative study of the fluorescent antibody test for rabies diagnosis in fresh and formalin-fixed brain tissue specimens. Journal of virological methods, 95(1-2), 145–151. https://doi.org/10.1016/s0166-0934(01)00304-4.
35. Xu G., Weber P., Hu Q., Xue H., Audry L., Li C., Wu J., & Bourhy H. (2007). A simple sandwich ELISA (WELYSSA) for the detection of lyssavirus nucleocapsid in rabies suspected specimens using mouse monoclonal antibodies. Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization, 35(4), 297–302. https://doi.or/10.1016/j.biologicals.2006.10.002.

# ДОДАТКИ

## Додаток 1

*Кутовий штамп*

До _____

_____
(назва лабораторії)

_____

_____
(адреса)

**СУПРОВІДНА**

При цьому направляється _____
(мета та вид досліджень)

_____

патологічний матеріал_____

_____

Належить _____
( назва господарства, ферми, відділення, прізвище власника тварини)

_____

Місце розташування
господарства_____

_____

Вид і вік тварин _____

_____

Дата виявлення перших ознак захворювання_____

_____

Підозра на захворювання, клінічні ознаки та патолого-анатомічні зміни_____

_____

_____

_____

_____

_____

Кількість загиблих тварин та з ознаками захворювання_____

_____

_____

Лікувальні заходи і вакцинація, проведені в останні два тижні_____

_____
(вказати, які антибактеріальні препарати застосовували,

_____
дата застосування, протягом якого часу)

Кількість спалахів захворювання_____

Дата відправки пат. матеріалу та час відправки_____

_____ _____ _____
(посада) (підпис) (ПІБ)

_____ _____ _____
(посада) (підпис) (ПІБ)

Відмітка державної лабораторії ветеринарної медицини

Дата надходження матеріалу_____

Доставлено проб _____

Забраковано_____

**Додаток 2**

ЗАТВЕРДЖЕНО
Наказ Міністерства аграрної політики та продовольства України
11 жовтня 2018 року N 490

Зареєстровано
в Міністерстві юстиції України
26 грудня 2018 р. за N 1464/32916

**АКТ**
**відбору зразків**

Дата відбору зразків "___" _____ р. N _____

Місце відбору зразків _____
_____
(найменування та місцезнаходження (для юридичної особи) або прізвище, ім'я та по батькові та адреса зареєстрованого місця проживання (для фізичної особи - підприємця), місце відбору зразків, адреса електронної пошти)

_____
_____
_____
_____

Комісія у складі _____
_____
(посадові особи (державний (державні) ветеринарний (ветеринарні) інспектор (інспектори)), державний (державні) інспектор (інспектор)) центрального органу виконавчої влади, що реалізує державну політику у сфері безпечності та окремих показників якості харчових продуктів)

_____
_____

у присутності _____
_____
_____
_____
_____
(посада, прізвище, ім'я та по батькові оператора ринку або уповноваженої ним особи)

I. Мета відбору зразків:

☐ Плановий відбір ☐ Позаплановий відбір

❑ Моніторингові дослідження (випробування) залишків

❑ Інші моніторингові дослідження (випробування)

❑ Відбір у зв'язку з підозрою захворювання тварин

❑ Інші дослідження

II. Для відбору зразків об'єктів[1]

_____

(назва об'єктів; потужність - виробник, країна походження; дата виробництва, дата "вжити до", мінімальний термін придатності; номер, серія партії; тип матриці зразка, його вага; вид, вік, ідентифікаційний номер тварини, від якої відібрано зразок; стадо, ферма)

_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____

III. Для відбору зразків біологічних продуктів, патологічного матеріалу, об'єктів довкілля[1]

_____

(тип матриці зразка; вік, ідентифікаційний номер тварини, від якої відібрано зразок[2]; стадо, ферма, дата захворювання та/або загибелі, клінічна картина, анамнестичні дані, попередній діагноз; об'єкт навколишнього середовища, з якого взято змиви; інший матеріал)

_____
_____

IV. Інформація про відібраний зразок

1. Тип пакування/фасування: _____
_____

2. Умови зберігання _____
_____

3. Інформація про транспортний засіб _____

(номер автомобіля, вагона, судна, контейнера тощо)

_____

4. Умови транспортування зразка _____
_____

5. Супроводжувальні документи:

_____

(дата та номер супроводжувальних документів: відповідні ветеринарні документи, товарно-

транспортні накладні, якісні посвідчення тощо)

_____

_____

6. Відбір зразка проводиться згідно з

_____

(метод (методика) відбору зразків із зазначенням нормативно-правового акта, ДСТУ та іншого)

_____

_____

_____

(назва показника, за яким має бути проведено відповідне лабораторне дослідження (випробування))

_____

_____

(може зазначатися додаткова інформація: температура оточуючого середовища (° С) під час відбору зразків; наявність органолептичних змін; обладнання, що використовувалося для відбору, тощо)

7. Зразки у кількості _____ відправлено до: _____

_____

(назва та місцезнаходження уповноваженої лабораторії)

_____

_____

Зразок опломбований _____

(час та дата опломбування, номер пломби)

_____

V. Додаткова інформація:

| | | |
|---|---|---|
| Арбітражний зразок | ☐ Відібрано | ☐ Не відібрано |
| Витрати, пов'язані з дослідженнями (випробуваннями), оплачує | ☐ Держпродспоживслужба | ☐ Оператор ринку |
| Протокол (експертний висновок, звіт) за результатами досліджень (випробувань) буде | ☐ Вручено особисто оператору ринку або уповноваженій ним особі | ☐ Надіслано поштою |
| | ☐ Надіслано за допомогою електронних засобів комунікації (уточнити дані) | |

Підписи посадових осіб Держпродспоживслужби, які брали участь у відборі зразків:

| _____ | _____ | _____ |
|---|---|---|
| (посада) | (підпис) | (ініціали та прізвище) |

М. П.

| _____ | _____ | _____ |
|---|---|---|
| (посада) | (підпис) | (ініціали та прізвище) |
| _____ | _____ | _____ |
| (посада) | (підпис) | (ініціали та прізвище) |

Оператор ринку або уповноважена ним особа:

| _____ | _____ | _____ |
|---|---|---|
| (посада) | (підпис) | (ініціали та прізвище) |
| _____ | _____ | _____ |
| (посада) | (підпис) | (ініціали та прізвище) |

Інші особи, які брали участь у проведенні відбору зразків:

| _____ | _____ | _____ |
|---|---|---|
| (посада) | (підпис) | (ініціали та прізвище) |
| _____ | _____ | _____ |
| (посада) | (підпис) | (ініціали та прізвище) |

Примірник цього акта на ☐☐ сторінках отримано ☐☐.☐☐.☐☐☐☐:

| _____ | _____ | _____ |
|---|---|---|
| (посада) | (підпис) | (ініціали та прізвище) |

_____

[1] Частини II та III акта відбору зразків заповнюються в залежності від мети відбору зразків.

[2] До акта відбору зразків додається перелік (опис) тварин, від яких було відібрано зразки.

**Додаток 3**
**Облікова картка інфікованих мишей**

**Дата інфікування** _____ _
**Заключення** _____

**Номер проби** _____

**Кількість мишей** _____

| № миші | День після інфікування | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | Результат тесту МФА |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | |
| 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ... | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ... | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ... | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ... | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ... | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ... | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| n | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

**ПІЩАНСЬКИЙ Олександр Вікторович**
кандидат ветеринарних наук, директор Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи
**РУДОЙ Олексій Васильович**
кандидат ветеринарних наук, старший науковий співробітник науково-дослідного вірусологічного відділу Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи
**СУШКО Микола Іванович**
завідувач науково-дослідного молекулярно-генетичного відділу Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи
**МАНДИГРА Світлана Станіславівна**
кандидат ветеринарних наук, старший науковий співробітник науково-дослідного молекулярно-генетичного відділу Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи
**АЛЄКСЄЄВА Галина Борисівна**
кандидат ветеринарних наук, старший науковий дослідник, заступник директора з інфекційної патології Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи
**ДРОЖЖЕ Жанна Миколаївна**
кандидат ветеринарних наук, старший науковий дослідник, старший науковий співробітник науково-дослідного вірусологічного відділу Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи
**КОВАЛЕНКО Вячеслав Леонідович**
доктор ветеринарних наук, професор, головний науковий співробітник науково-дослідного вірусологічного відділу Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи
**УХОВСЬКИЙ Віталій Вікторович**
доктор ветеринарних наук, професор, завідувач науково-дослідного епізоотологічного відділу Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи

# МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ. ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА СКАЗУ У ТВАРИН

## В авторській редакції

Підписано до друку __.__.____ р. Формат _____
Папір друк. № 2. Друк офсетний. Ум. друк. арк. ___
Тираж ____ прим. Зам. №__

Видавець: (назва підприємства)
(поштова адреса видавця)
Тел.: (телефони видавця)
E-mail: (електронна пошта видав